



HAL
open science

Hypothermie thérapeutique et transition de perméabilité mitochondriale dans le syndrome post-arrêt cardiaque

Vincent Jahandiez

► **To cite this version:**

Vincent Jahandiez. Hypothermie thérapeutique et transition de perméabilité mitochondriale dans le syndrome post-arrêt cardiaque. Santé. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1289 . tel-03039645

HAL Id: tel-03039645

<https://theses.hal.science/tel-03039645>

Submitted on 4 Dec 2020

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.



N°d'ordre NNT :

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 205
Ecole Doctorale Interdisciplinaire Sciences-Santé

Spécialité de doctorat : Science et santé
Discipline : Physiologie, Biologie des organismes, populations, interactions

Soutenue publiquement le 03/12/2019, par :

Vincent JAHANDIEZ

**Hypothermie thérapeutique et
transition de perméabilité mitochondriale
dans le syndrome post-arrêt cardiaque**

Devant le jury composé de :

Professeur Michel OVIZE	Université de Lyon	Président
Docteur Elise BELAIDI-CORSAT	Université de Grenoble	Rapporteuse
Professeur Alexandre LAUTRETTE	Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Professeur Carole SCHWEBEL	Université de Grenoble	Examinatrice
Professeur Laurent ARGAUD	Université de Lyon	Co-directeur
Docteur Martin COUR	Université de Lyon	Co-directeur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Damien VERHAEGHE

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est - Claude Bernard	Doyen : M. Gilles RODE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud - Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. Xavier PERROT
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

UFR Biosciences	Directrice : Mme Kathrin GIESELELER
Département Génie Informatique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosaria FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur : M. Marc BUFFAT
UFR -Faculté des Sciences	Administrateur provisoire : M. Bruno ANDRIOLETTI
UFR STAPS	Directeur : M. Yannick VANPOUILLE
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Ecole Polytechnique Universitaire Lyon 1	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : M. Bernard BIGOT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAPEYRON

“...la vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance.”

Revue des Deux Mondes, 1867

Claude Bernard

Ce travail a été réalisé au sein de :

Laboratoire CarMeN - INSERM U1060 (Pr. Hubert Vidal)

Equipe 5 « Cardioprotection » (Pr. Michel Ovize)

IHU OPERA - Cardioprotection

U1060 CarMeN

Bâtiment B13

59 Boulevard Pinel

69500 BRON

Sous la co-direction du **Pr. Laurent Argaud** et du **Dr. Martin Cour.**

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout particulièrement :

- Au Professeur Laurent Argaud qui a encadré l'intégralité de ce travail. Je le remercie d'avoir accepté de diriger ce travail avec le souci de transmettre sa rigueur et ses connaissances. La force de son implication à toutes les étapes a permis l'aboutissement de ce travail.
- Au Docteur Martin Cour qui a également encadré ce travail depuis ses débuts avec un optimisme et une bonne humeur constants, et qui a su transmettre son goût pour la recherche scientifique.
- Au Professeur Michel Ovize qui nous fait l'honneur de présider ce jury et qui nous a accueilli avec confiance et bienveillance dans son laboratoire.
- Aux rapporteurs de cette thèse, le Docteur Elise Balaidi-Corsat et le Professeur Alexandre Lautrette qui ont pris le temps nécessaire, malgré leurs multiples obligations, d'examiner notre travail.
- Au Professeur Carole Schwebel qui nous fait l'amitié d'accepter notre invitation et d'apporter un regard critique sur notre travail.
- Au Docteur Bruno Pillot dont la dextérité et la force de travail ont permis le développement du modèle souris. Merci pour tout nos moments partagés dans une bonne humeur qui a permis de surmonter les difficultés.
- A tous les collègues de l'équipe 5 du laboratoire INSERM U1060 pour leur accueil et leur bonne humeur. En particulier, je remercie Joseph Loufouat et Murielle Robert pour leur aide dès mes premiers pas de jeune chercheur ainsi que Abdallah, Thomas, Sandrine, Lionel, Marlène, Maryline, Emmanuelle, Noëlle, Marie-Christine et Radu (CERMEP).

- A tous mes collègues de N-Réanimation pour ces quatre très belles années à travailler avec fierté à vos côtés.
- A ma famille.
- A mes amis.
- A Mathieu.

LISTE DES PUBLICATIONS EN RAPPORT AVEC LA THEMATIQUE DE CE TRAVAIL EXPERIMENTAL

Publications originales dans des revues internationales

Cour M, **Jahandiez V**, Loufouat J, Ovize M, Argaud L. Minor Changes in Core Temperature Prior to Cardiac Arrest Influence Outcomes: An Experimental Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20(4):407–413.

Jahandiez V, Cour M, Bochaton T, Abrial M, Loufouat J, Gharib A, Varennes A, Ovize M, Argaud L. Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition. *Basic Res Cardiol.* 2017;112(4):35.

Jahandiez V, Cour M, Abrial M, Loufouat J, Ovize M, Argaud L. Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest: Involvement of the Risk Pathway in Mitochondrial PTP-Mediated Neuroprotection. *Shock.* 2019;52(2):224–229.

Cour M, **Jahandiez V**, Bochaton T, Venet F, Ovize M, Monneret G, Argaud L. Cyclosporine A prevents ischemia-reperfusion-induced lymphopenia after out-of-hospital cardiac arrest: A predefined sub-study of the CYRUS trial. *Resuscitation.* 2019;138:129–131.

Communications scientifiques dans des congrès

2013 M Cour, **V Jahandiez**, M Abrial, J Loufouat, R Ferrera, M Ovize, L Argaud. Effets mitochondriaux de l'hypothermie thérapeutique dans l'arrêt cardiaque : étude expérimentale. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF), Paris.

2013 **V Jahandiez**, M Cour, M Abrial, A Gharib, R Ferrera, M Ovize, L Argaud. Mitochondrial effects of therapeutic hypothermia in cardiac arrest: experimental study. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Marseille.

2014 M Cour, **V Jahandiez**, M Abrial, J Loufouat, L Argaud. Absence d'effet de l'hypothermie thérapeutique sur la cyclosporine A pour prévenir le syndrome post-arrêt cardiaque : étude expérimentale. Congrès de la Société de Réanimation de Langue Française (SRLF), Paris.

2014 **V Jahandiez**, M Cour, M Abrial, J Loufouat, A Gharib, M Ovize, L Argaud. Inhibition pharmacologique du pore de transition de perméabilité mitochondriale et stress du réticulum endoplasmique dans l'arrêt cardiaque expérimental. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Strasbourg.

2015 **V Jahandiez**, M Cour, J Loufouat, L Argaud. Hypothermie thérapeutique et inhibition pharmacologique du pore de transition de perméabilité mitochondrial dans la prévention du syndrome post-arrêt cardiaque : étude expérimentale. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Toulouse.

2016 **V Jahandiez**, M Cour, M Abrial, J Loufouat, L Argaud , M Ovize. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore by therapeutic hypothermia after cardiac arrest: involvement of RISK signaling pathway. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Dijon.

2017 **V Jahandiez**, M Cour, B Pillot, N Gallo-Bona, M Ovize, L Argaud. Mitochondrial cyclophilin D-dependent effects of therapeutic hypothermia in post-cardiac arrest syndrome. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Nantes.

2018 M Cour, **V Jahandiez**, B Pillot, N Galo-Bona, M Ovize, L Argaud. A comparison of therapeutic hypothermia and genetic mitochondrial permeability transition pore inhibition in a murine model of cardiac arrest. Congrès du Printemps de la Cardiologie, Montpellier.

2018 Martin Cour, **Vincent Jahandiez**, Bruno Pillot, Michel Ovize, Laurent Argaud. Mitochondrial Cyclophilin D as a Target for Cardiac Arrest Resuscitation: Insight from Knockout Mice. Congrès de l'American Heart Association, Chicago.

Autres publications

Berend M, **Jahandiez V**, Wallet F, Hacquard H, Tronc F, David JS. Management of tracheobronchial ruptures. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2010;29(6):491–493.

Cour M, Abrial M, **Jahandiez V**, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, Argaud L. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol*. (1985). 2014;117(8):930–936.

Faucher E, Cour M, **Jahandiez V**, Grateau A, Baudry T, Hernu R, Simon M, Robert JM, Michallet M, Argaud L. Short- and long-term outcomes in onco-hematological patients admitted to the intensive care unit with classic factors of poor prognosis. *Oncotarget*. 2016;7(16):22427–22438.

Baudry T, Hernu R, Valleix B, **Jahandiez V**, Faucher E, Simon M, Cour M, Argaud L. Cirrhotic Patients Admitted to the ICU with Septic Shock: Factors Predicting Short and Long-Term Outcome. *Shock*. 2019;52(4):408–413.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	6
I - SYNDROME POST-ARRET CARDIAQUE	7
A - Définition et épidémiologie	7
B - Physiopathologie	8
1 - Lésions cérébrales	10
1.1 - Altération de l'homéostasie calcique	10
1.2 - Anomalies de la vascularisation cérébrale	11
1.3 - Facteurs aggravants les lésions cérébrales	11
2 - Dysfonction myocardique	12
2.1 - Rôle des ROS	13
2.2 - Perturbation de l'homéostasie calcique	13
2.3 - Rôle de l'inflammation	13
2.4 - Facteurs favorisant la dysfonction myocardique.....	14
3 - Réponse systémique à l'ischémie-reperfusion.....	14
C - Prise en charge thérapeutique	16
1 - Hypothermie thérapeutique	16
2 - Autres traitements spécifiques	16
3 - Mesures non spécifiques	17
II - MITOCHONDRIES ET ISCHEMIE-REPERFUSION	21
A - Mitochondrie	21
1 - Structure.....	21
2 - Fonctionnement	22
2.1 - Phosphorylation oxydative.....	22
2.2 - Production de radicaux libres de l'oxygène	24
2.3 - Homéostasie calcique.....	25
3 - Pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP).....	26
3.1 - Structure moléculaire.....	27
3.2 - Inhibition pharmacologique.....	32
B - Concept d'ischémie-reperfusion	34
1 - Conséquences cellulaires de l'ischémie	35
2 - Conséquences cellulaires de la reperfusion	36
3 - Principaux déterminants de l'ouverture du PTP à la reperfusion	36
4 - Voies de mort cellulaire de l'ischémie-reperfusion	38
3.1 - Nécrose	39
3.2 - Apoptose.....	39
3.3 - Autophagie.....	43
5 - Concept d'ischémie-reperfusion et arrêt cardiaque	44

III - PROTECTION CELLULAIRE, MITOCHONDRIE ET ARRET CARDIAQUE	45
A - Conditionnement ischémique et pharmacologique	45
1 - Pré-conditionnement ischémique	45
2 - Post-conditionnement ischémique	46
3 - Conditionnement ischémique à distance	46
4 - Conditionnement ischémique et arrêt cardiaque	47
5 - Mécanismes protecteurs impliqués	48
5.1 - Inducteurs	49
5.2 - Médiateurs	50
5.3 - Effecteurs	52
5.4 - Mécanismes du conditionnement ischémique à distance	55
6 - Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A	56
6.1 - Historique	56
6.2 - Pharmacologie	57
6.3 - Application dans l'ischémie-reperfusion	58
B - Hypothermie thérapeutique	65
1 - Historique	65
2 - Mécanismes d'action	66
2.1 - Cardioprotection	66
2.2 - Neuroprotection	67
3 - Application clinique dans l'arrêt cardiaque	70
3.1 - Principales études cliniques	70
3.2 - Techniques	73
3.3 - Délai d'application	76
3.4 - Durée	77
IV - OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL DE RECHERCHE	78
MATERIEL ET METHODES	79
I - MODELE LAPIN D'ARRET CARDIAQUE	80
A - Considérations éthiques	80
B - Protocole chirurgical	80
C - Arrêt cardiaque et réanimation cardio-pulmonaire	81
D - Groupes expérimentaux	81
II - MODELE SOURIS D'ARRET CARDIAQUE	83
A - Considérations éthiques	83
B - Protocole chirurgical	83

C - Arrêt cardiaque et réanimation cardio-pulmonaire.....	84
1 - Mise au point du modèle asphyxique d'arrêt cardiaque	84
2 - Mise au point de la réanimation cardio-pulmonaire	85
2.1 - Massage cardiaque externe	85
2.2 - Adrénaline.....	85
2.3 - Correction de l'acidose métabolique.....	85
3 - Description	86
D - Groupes expérimentaux	86
III - TECHNIQUES UTILISEES	88
A - Hémodynamique	88
1 - Pression aortique	88
2 - Echocardiographie	88
B - Evaluation neurologique	89
1 - Réactivité pupillaire	89
2 - Score neurologique	89
3 - IRM cérébrale.....	90
C - Analyses biochimiques	90
D - Analyse des mitochondries	91
1 - Isolation des mitochondries.....	91
1.1 - Mitochondries myocardiques	91
1.2 - Mitochondries cérébrales.....	91
2 - Mesure de la capacité de rétention calcique	91
3 - Mesure de la consommation d'oxygène mitochondrial	92
E - Western blot et immunoprécipitation.....	92
1 - Extraction tissulaire	92
2 - Western blot.....	93
3 - Immunoprécipitation	93
IV - REACTIFS UTILISES.....	94
V - ANALYSES STATISTIQUES	94
RESULTATS ET DISCUSSION	96
I - EFFETS DE LA TEMPERATURE CORPORELLE SUR LA TRANSITION DE PERMEABILITE MITOCHONDRIALE DANS L'ARRET CARDIAQUE REANIME	
A - Etude n°1.....	97
B - Synthèse des résultats et discussion	105

II - PREVENTION DU SYNDROME POST-ARRET CARDIAQUE PAR L'HYPOTHERMIE THERAPEUTIQUE VIA UN MECANISME D'INHIBITION DU PORE DE TRANSITION MITOCHONDRIAL DEPENDANT DE LA CYCLOPHILINE D	
A - Etude n°2.....	106
B - Résultats complémentaires	116
C - Synthèse des résultats et discussion	117
III - ROLE DE LA VOIE RISK DANS LES MECANISMES NEUROPROTECTEURS MITOCHONDRIAUX DE L'HYPOTHERMIE THERAPEUTIQUE DANS L'ARRET CARDIAQUE REANIME	
A - Etude n°3.....	119
B - Synthèse des résultats et discussion	126
IV - ROLE DE LA CYCLOPHILINE D ET L'HYPOTHERMIETHERAPEUTIQUE SUR LE PRONOSTIC APRES UN ARRET CARDIAQUE REANIME	
A - Etude n°4	127
B- Synthèse des résultats et discussion	146
CONCLUSION	154
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	157

LISTE DES ABREVIATIONS

AC	Arrêt cardiaque
ACEH	Arrêt cardiaque extrahospitalier
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine di-phosphate
Akt	Sérine/thréonine kinase B
ALAT	Alanine aminotransférase
AMPA	<i>Amino-3-hydroxy-5-Méthyl-4-isoxazole Propionic Acid</i>
AMPK	<i>Adenosine Monophosphate–activated Protein kinase</i>
ANOVA	<i>Analysis Of Variance</i>
ANT	<i>Adenine Nucleotide Translator</i>
APAF1	<i>Apoptotic Peptidase Activating Factor 1</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASC	Air sous la courbe
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATP	Adénosine tri-phosphate
AVC	Accident vasculaire cérébral
BAK	<i>BCL-2 Antagonist killer</i>
BAX	<i>BCL-2 Associated X protein</i>
BCA	<i>BiCinchoninic Acid</i>
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BIP	<i>Binding Immunoglobulin Protein</i>
BPCO	Broncho-pneumopathie chronique obstructive
Bpm	Battements par minute
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca²⁺	Ion calcium
CDA	Coefficient de diffusion apparent
CEE	Choc électrique externe
CK	Créatine kinase
CO₂	Dioxyde de carbone
CPC	<i>Cerebral Performance Category</i>
CRC	Capacité de rétention calcique

CsA	Cyclosporine A
CVVH	<i>Continuous VenoVenous Hemofiltration</i>
CX 43	Connexine 43
CypA	Cyclophiline A
CypD	Cyclophiline D
CypD^{-/-}	<i>Cyclophiline D deficiency</i>
CypD-KO	<i>Cyclophiline D Knock-Out</i>
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
ECG	Electrocardiogramme
EEG	Electroencéphalogramme
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EP	Embolie pulmonaire
EPO	Erythropoïétine
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation</i>
ERK	<i>Extracellular Regulated Kinase</i>
ETT	Echographie cardiaque trans-thoracique
FADD	<i>Fas-Associated Death Domain protein</i>
FADH₂	Flavine adénine dinucléotide, forme réduite
FASL	<i>FAS-Ligand</i>
FC	Fréquence cardiaque
FiO₂	Fraction inspirée en oxygène
FRSVG	Fraction de raccourcissement de surface du ventricule gauche
FV	Fibrillation ventriculaire
GluR2	<i>Glutamate Receptor 2</i>
GMP	Guanosine monophosphate
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GOCS	<i>Glasgow Outcome Coma Scale</i>
GRP78	<i>Glucose-Regulated Protein 78</i>
GSK3β	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 beta</i>
H⁺	Proton
H₂O₂	Peroxyde d'hydrogène
HCX	<i>H⁺/Ca²⁺ exchanger</i>
HIF1α	<i>Hypoxia-Inductible Factor-1α</i>

HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
I/R	Ischémie-Reperfusion
IC	Intervalle de confiance
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IDM	Infarctus du myocarde
IL	Interleukine
IM	Intramusculaire
IQ	Interquartile
IRE1	<i>Inositol Requiring Protein 1</i>
IV	Intraveineux
JAK	<i>Janus Kinase</i>
K⁺	Ion potassium
K_{ATP}	Canaux potassiques ATP-dépendant
kDa	Kilodalton
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MCE	Massage cardiaque externe
MCI	Massage cardiaque interne
MCU	<i>Mitochondrial Calcium Uniporter</i>
MDR-1	<i>Multi-Drug Resistance-1</i>
Mg²⁺	Ion magnésium
mitoK_{ATP}	Canaux potassiques mitochondriaux ATP-dépendant
MMC	<i>Mitochondrial Mega Channel</i>
Mn-SOD	<i>Manganese superoxide dismutase</i>
Mn²⁺	Ion manganèse
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
NCLX	<i>Na⁺/Ca²⁺ Exchanger</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor-Kappa B</i>
NFATc	<i>Nuclear Factor of Activated T-cells</i>
NH₃	Nitruite d'hydrogène
NIM811	N-méthyl-4-isoleucine-ciclosporine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NO	Oxyde nitrique
NOS	<i>Oxyde Nitrique Synthase</i>

O₂^{•-}	Anion superoxyde
OSCP	<i>Oligomycin Sensitivity Binding Protein</i>
PaCO₂	Pression artérielle partielle en dioxyde de carbone
PAM	Pression artérielle moyenne
PAS	Pression artérielle systolique
PBR	<i>Peripheral Benzodiazepine Receptor</i>
PCI	Pré-conditionnement ischémique
PERK	<i>Protein kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
pH	Potentiel hydrogène
Pi	Phosphate inorganique
PI3K	<i>Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase</i>
PiC	<i>Phosphate inorganic Carrier</i>
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PKG	Protéine kinase G
PostCI	Post-conditionnement ischémique
PTP	Pore de transition de perméabilité mitochondrial
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RACS	Restauration d'une activité circulatoire spontanée
RC	Rythme choquable
RCI	<i>Respiratory Control Index</i>
RCP	Réanimation cardio-pulmonaire
RE	Réticulum endoplasmique
RIDD	<i>Regulated-IRE1 Dependent Decay</i>
RIPA	<i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
RIPK	<i>Receptor Interacting Protein Kinase</i>
RISK	<i>Reperfusion Injury Salvage Kinase</i>
RNC	Rythme non choquable
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RR	Risque relatif
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SAFE	<i>Survivor Activating Factor Enhancement pathway</i>
SaO₂	Saturation pulsée en oxygène
SCA	Syndrome coronarien aigu

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic Acid</i>
SLB	Single cell Lysis Buffer
SOFA	<i>Sequential Organ Failure</i>
SPG7	<i>Spastic paraplegia 7</i>
SPhK	Sphingosine kinase
Sr²⁺	Ion strontium
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
STEMI	<i>ST-Elevation Myocardial Infarction</i>
SVGTD	Surface ventriculaire gauche télé-diastolique
SVGTS	Surface ventriculaire gauche télé-systolique
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR2	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor 2</i>
TOM	<i>Translocase of the Outer Membrane</i>
TSPO	<i>Mitochondrial translocator protein</i>
TTM	<i>Targeted Temperature Management</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VDAC	<i>Voltage-Dependant Anion Chanel</i>
VG	Ventricule gauche
WT	<i>Wild Type</i>
XBP1	<i>X-Box Binding Protein 1</i>

INTRODUCTION

I - SYNDROME POST-ARRET CARDIAQUE

A - Définition et épidémiologie

Chaque année, plus de 300000 personnes sont victimes d'un arrêt cardiaque (AC) extrahospitalier aux Etats-Unis,¹ et approximativement autant en Europe.^{2,3} En France, on estime le nombre de victime d'un AC extrahospitalier à 50000 par an. Il est classique de distinguer deux grandes catégories d'AC selon que le rythme initial correspond à un rythme pouvant bénéficier d'un choc électrique externe (CEE) lors de la réanimation cardio-pulmonaire (RCP) (rythme choquable) ou ceux ne pouvant pas bénéficier d'un CEE (rythme non choquable). Le pronostic global des AC avec rythme choquable est meilleur que celui des AC avec rythmes non choquables. Malgré d'évidents progrès réalisés dans la prise en charge de l'AC (mise à jour et large diffusion des recommandations de RCP pour le public et les professionnels de santé, mise à disposition du grand public de défibrillateurs ventriculaires, développement de centres experts dans les soins de réanimation des patients victimes d'AC), la mortalité après un AC reste très élevée. Ainsi, le taux de survie à la sortie de l'hôpital n'est que de 10,6% tous rythmes confondus aux Etats-Unis.¹ Ce taux est de 29% en cas de fibrillation ventriculaire (FV).¹ Dans une étude européenne prospective multicentrique, la survie hospitalière tous rythmes confondus était de 10,3%.³ A noter que dans cette étude, parmi les AC de meilleurs pronostics (cause cardiaque, rythme choquable et survenue devant témoins) la France présentait l'une des plus faibles survies hospitalières (<10%). Une vaste étude à partir du « *Guidelines-Resuscitation registry* » entre 2000 et 2009 retrouvait bien une amélioration de la survie hospitalière de 13,7% en 2000 à 22,4% en 2009 mais cette amélioration était principalement due à l'amélioration de la survie après la RCP initiale.⁴ Cette mortalité élevée s'explique notamment par la survenue précoce, dans les suites d'un AC réanimé, de défaillances d'organes multiples. Dr. Vladimir Negovsky est le premier à décrire en 1972 cette « condition pathologique spécifique » associant une défaillance hémodynamique, respiratoire, rénale, hépatique réalisant une défaillance multiviscérale réfractaire, conséquence directe de l'ischémie-reperfusion (I/R) globale. Il proposa le terme de « *postresuscitation disease* ». ⁵ En 2008, faisant le constat que le terme de « *resuscitation* » avait progressivement changé de signification pour inclure les

traitements d'états de choc variés et que le terme de « *postresuscitation* » impliquait de façon erronée que la réanimation était terminée, un consensus scientifique a retenu le nouveau terme de « syndrome post-AC ». ⁶

B - Physiopathologie

Le syndrome post-AC est une association complexe de processus physiopathologiques qui associent (tableau 1) :

- des lésions neurologiques
- une dysfonction myocardique
- une réponse systémique à l'I/R

La défaillance cardiovasculaire est responsable d'une majorité des décès précoces et les lésions cérébrales d'une majorité des décès tardifs. ⁷⁻⁹ S'associe à ce syndrome la persistance du processus pathologique causal. La sévérité de ces atteintes varie selon la durée de l'AC, sa cause et les comorbidités du patient. La variété d'atteintes d'organes va également en elle-même rendre les soins médicaux plus complexes. Cela demande des compétences pluridisciplinaires et des plateaux techniques parfois lourds tout au long de la chaîne de prise en charge du patient allant de phase pré-hospitalière à la sortie de réanimation.

Par ailleurs, la mise en jeu de ces soins lourds se heurte parfois à un pronostic d'emblée très sombre et donc à la délicate question de l'éventuelle futilité des traitements mise en œuvre alors même que l'évaluation précise du pronostic neurologique ne peut souvent n'être réalisée qu'après trois jours de réanimation.

Tableau 1 - Syndrome post-AC : physiopathologie et manifestations cliniques (d'après ⁶).

Syndrome	Physiopathologie	Manifestation clinique
Lésions neurologiques	<ul style="list-style-type: none"> • Altérations de l'autorégulation du débit sanguin cérébral • Œdème cérébral • Dégénération neuronale post-ischémique 	<ul style="list-style-type: none"> • Coma • Convulsions • Myoclonies • Atteintes cognitives • Etat végétatif • Syndrome parkinsonien • AVC • Mort encéphalique
Dysfonction myocardique	<ul style="list-style-type: none"> • Hypokinésie globale (sidération myocardique) • Baisse du débit cardiaque • SCA 	<ul style="list-style-type: none"> • Hypotension • Arythmies • Choc cardiogénique
Réponse systémique à l'I/R	<ul style="list-style-type: none"> • Réponse inflammatoire systémique • Vasoplégie • Hypercoagulation • Insuffisance surrénalienne • Altération de l'oxygénation tissulaire • Immunodépression 	<ul style="list-style-type: none"> • Ischémie tissulaire • Hypotension • Choc vasoplégique • Fièvre • Hyperglycémie • Défaillance multiviscérale
Pathologie causale	<ul style="list-style-type: none"> • Maladie cardiovasculaire (SCA, IDM) • Maladie pulmonaire (BPCO, asthme) • Maladie du SNC (AVC) • Maladie thromboembolique (EP) • Toxique (overdose) • Infection (sepsis, pneumonie) • Hypovolémie (hémorragie, déshydratation) 	<ul style="list-style-type: none"> • Spécifique à l'étiologie causale mais compliquée par le syndrome post-AC

AVC : accident vasculaire cérébral ; SCA : syndrome coronarien aigu ; IDM : infarctus du myocarde ; BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive ; EP : embolie pulmonaire.

1 - Lésions cérébrales

Les lésions cérébrales anoxo-ischémiques sont la première cause de mortalité des patients victimes d'un AC réanimé.⁶ Dans une étude portant sur des patients admis en réanimation après AC entre 1998 et 2003, 68% des décès des arrêts cardiaques extra-hospitaliers étaient la conséquence des lésions neurologiques.¹⁰ Une étude plus récente concluait également à la prépondérance des lésions neurologiques dans les causes des patients décédés dans les suites d'un AC.⁸

Les lésions cérébrales surviennent très rapidement dans les suites d'un AC car le cerveau est un organe particulièrement sensible à l'ischémie : à titre d'exemple, le stock neuronal en oxygène est épuisé dans les 20 secondes suivants l'AC et les stocks en glucose et adénosine triphosphate (ATP) sont épuisés dans les 5 minutes.¹¹ Les différentes régions du cerveau n'ont pas la même vulnérabilité à l'ischémie. Ainsi, la substance grise est plus vulnérable à l'ischémie que la substance blanche. Les régions les plus vulnérables sont situées dans l'hippocampe, le cervelet, le striatum et le cortex cérébral. Au sein même de ces différentes régions, la vulnérabilité des neurones peut être variable selon le type de neurones et leur localisation précise.¹²

1.1 - Altération de l'homéostasie calcique

La physiopathologie des lésions anoxo-ischémiques est complexe et n'est probablement que partiellement comprise. Dès que l'apport en oxygène décroît, la production d'ATP cesse. La baisse de l'apport en oxygène entraîne, via le métabolisme anaérobie, une accumulation intracellulaire d'acide lactique et d'ion H^+ provoquant une acidose intracérébrale. La baisse de la production d'ATP entraîne l'inhibition de la pompe ATP-dépendante Na^+/K^+ entraînant la dépolarisation de la cellule. L'altération de l'homéostasie calcique à plusieurs niveaux va ensuite jouer un rôle majeur dans la physiopathologie des lésions cérébrales. En effet, cette dépolarisation entraîne l'ouverture des canaux calcium et sodium dépendants et la libération de neurotransmetteurs excitotoxiques, notamment le glutamate, dans l'espace extracellulaire. L'accumulation de glutamate extracellulaire va aggraver l'accumulation de Ca^{2+} et de Na^+ intracellulaire par l'intermédiaire des récepteurs post-synaptiques NMDA (N-méthyl-D-aspartate) et AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoxazole-4-propionique). Le glutamate agit également via des récepteurs

métabotropiques qui déclenchent une libération de calcium par le réticulum endoplasmique. La perte du gradient de sodium va inverser la pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et aggraver l'afflux de calcium. Cet afflux massif de calcium intracellulaire déclenche une lipolyse, une protéolyse, une dégradation de l'ADN, une activation de kinase et de phosphatase qui vont altérer le fonctionnement protéinique et l'expression génique. L'accumulation de Ca^{2+} intracellulaire entraîne également un dysfonctionnement de la mitochondrie via l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) et la production de radicaux libres de l'oxygène (ROS) ainsi que des radicaux libres de l'azote. Ces radicaux libres entraînent des lésions de l'ADN, des protéines et des lipides.^{6,12,13} Enfin, la mort neuronale après arrêt cardiaque semble également impliquer des processus d'apoptose et d'autophagie.¹⁴

1.2 - Anomalies de la vascularisation cérébrale

Au moment de la reperfusion, des anomalies vasculaires, pouvant concerner plus de la moitié du parenchyme cérébral, sont à l'origine d'une inadéquation entre le flux sanguin et les besoins en oxygène.¹⁵ Ce phénomène, appelé « *no-reflow* », est la conséquence d'une augmentation des résistances vasculaires cérébrales (action α 1-adrenergique de l'adrénaline endogène et exogène), d'infarctus microvasculaires (activation de la cascade de la coagulation) et d'une baisse de la production de monoxyde d'azote (NO).^{11,13} Après normalisation des débits sanguins cérébraux, on observe alors la survenue d'un œdème cérébral et de micro-hémorragies. Ces ischémies micro-vasculaires s'accompagnent paradoxalement d'une macro-circulation hyperhémique conséquence de la perte de l'autorégulation du débit sanguin cérébral.⁶ Cette circulation hyperhémique semble aggraver l'œdème cérébral.

1.3 - Facteurs aggravants les lésions cérébrales

D'autres facteurs viennent aggraver dans les heures et jours suivants les lésions secondaires à l'I/R initiale. On retrouve parmi ceux-ci la baisse de la pression artérielle dans les suites d'un AC avec un recours aux amines vasopressives pour traiter la défaillance hémodynamique souvent nécessaire.⁶ Citons également l'hypoxie qui peut être favorisée par une atteinte pulmonaire concomitante d'origine infectieuse ou être secondaire à la réponse inflammatoire systémique ou encore les convulsions

provoquées par l'atteinte neuronale initiale.⁶ La hausse de la température centrale dans les suites de l'AC est également un déterminant important des lésions de reperfusion cérébrales.¹⁶⁻¹⁹ L'hyperglycémie de survenue fréquente et favorisée par le recours à l'adrénaline est associée à une surmortalité chez les patients ayant présenté un AC réanimé.²⁰⁻²² Enfin, très récemment, Perkins *et al.* ont réalisé une étude prospective randomisée sur plus de 8000 patients comparant l'injection d'adrénaline à un placebo chez des patients présentant un AC extrahospitalier.²³ L'adrénaline améliorerait bien la survie des patients à 30 jours. En revanche l'état neurologique des patients ayant bénéficié de l'injection d'adrénaline était moins bon que celui des patients du groupe contrôle. L'effet délétère de l'adrénaline sur la perfusion cérébrale est une des hypothèses évoquées.

2 - Dysfonction myocardique

La véritable incidence de la dysfonction myocardique chez les patients réanimés d'un AC est difficile à déterminer compte tenu des faibles effectifs retrouvés dans les publications, des définitions hétérogènes et des méthodes d'évaluation variables.²⁴ Elle semble néanmoins fréquente et associée à un pronostic plus péjoratif.²⁵ Elle se caractérise par sa réversibilité.²⁶ Sur 73 patients ayant bénéficié d'un monitoring hémodynamique invasif, Laurent *et al.* retrouvaient un index cardiaque au plus bas 8 heures après l'AC et un retour à la normale dans les 72 heures chez les survivants.²⁵ On parle donc de sidération myocardique ou « *stunned myocardium* », phénomène bien décrit dans l'IDM et défini comme une hypo-contraction en l'absence de toute nécrose cellulaire et caractérisée par sa réversibilité.^{27,28} Dans les suites d'un AC, la sidération myocardique se caractérise également par une atteinte biventriculaire et sa sensibilité aux traitements inotropes.^{29,30} L'atteinte concerne la fonction systolique et diastolique.^{29,31} La durée de l'ischémie avant MCE appelée « *no-flow* » ainsi que la durée des manœuvres de RCP appelée « *low-flow* » sont les déterminants principaux de la survenue de la dysfonction myocardique.²⁵

Outre les lésions myofibrillaires engendrées par l'ischémie puis par la réponse inflammatoire, la toxicité des ROS et la surcharge calcique en sont les deux composantes physiopathologiques principales.^{28,32}

2.1 - Rôle des ROS

Comme décrit plus haut, tout phénomène d'I/R se traduit par une production excessive de ROS. Ceux-ci semblent jouer un rôle primordial dans la sidération myocardique observée après un AC réanimé. Les ROS vont favoriser un flux entrant de calcium et son accumulation dans le sarcolemme, diminuer la sensibilité des myofilaments au calcium et endommager les myofilaments.³³ En effet, les ROS vont entraîner une charge calcique par des dommages du réticulum sarcoplasmiques entraînant une baisse de ses capacités de stockage et une augmentation du calcium cytosolique. La reperfusion va également aggraver la surcharge calcique par des mécanismes liés aux ROS (inhibition de la pompe Na^+/K^+ ATPase du sarcolemme, augmentation des échanges $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ conséquence de la surcharge en sodium).³⁴

2.2 - Perturbation de l'homéostasie calcique

De façon similaire aux troubles de l'homéostasie calcique décrits dans les lésions neuronales, l'ischémie myocardique est responsable d'une accumulation intracellulaire de sodium par diminution de la pompe Na^+/K^+ ATPase.³⁵ La pompe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ est réactivée à la reperfusion et va entraîner l'afflux de calcium intracellulaire responsable d'une activation d'enzymes protéolytiques calcium dépendantes.³⁴ Les mécanismes qui contrôlent la concentration intracellulaire de calcium restant intact, ceci explique la réponse du myocarde aux stimulations inotropes. Comme évoqué plus haut, Les ROS entraînent également une dysfonction du réticulum sarcoplasmique avec une capacité réduite à transporter le calcium.

2.3 - Rôle de l'inflammation

Conséquence de la réponse inflammatoire systémique qu'entraîne la réanimation d'un AC, on observe une hausse de cytokines telles que le $\text{TNF}\alpha$ et l'IL-1 qui pourrait participer à la dysfonction myocardique.³⁶

2.4 - Facteurs favorisant la dysfonction myocardique

- Massage cardiaque externe :

Le massage cardiaque externe (MCE) entraîne de façon mécanique des lésions myocardiques comme en témoigne l'élévation des marqueurs de nécroses myocardiques après RCP et les lésions histologiques en cas d'autopsie.^{37,38}

- Adrénaline :

L'injection d'adrénaline fait partie des recommandations pour la réanimation des AC.³⁹ Néanmoins, elle semble favoriser la dysfonction ventriculaire en augmentant les taux de lactates myocardiques, en altérant la microcirculation myocardique, en baissant les réserves en ATP, en favorisant la surcharge calcique, et en augmentant la consommation en oxygène du myocarde ischémique.⁴⁰⁻⁴²

- Défibrillation :

L'administration répétée de CEE peut aggraver la dysfonction diastolique et modifier les courbes pressions/volumes ventriculaires.⁴³ L'énergie croissante des CEE semble également aggraver la dysfonction ventriculaire.⁴⁴ Ces effets pourraient être liés, entre autres, à la production de ROS.⁴⁵

- Occlusion coronaire :

La survenue d'une sidération myocardique semble être indépendante de l'étiologie de l'AC.^{25,26,46} Néanmoins, l'occlusion coronaire, étiologie prédominante des AC extrahospitaliers, peut ajouter une dysfonction segmentaire à la dysfonction myocardique globale pouvant expliquer la tendance à une augmentation de l'incidence de la sidération myocardique dans les AC de cause cardiaque.^{25,46}

3 - Réponse systémique à l'ischémie-reperfusion

L'AC est un état de choc extrême puisqu'il entraîne un arrêt total de la circulation et de l'apport en oxygène aux tissus. De plus, ce déficit d'apport persiste pendant la RCP durant laquelle le débit cardiaque et l'apport en oxygène restent bien inférieurs aux besoins. De nombreux points communs avec la physiopathologie du sepsis ont été mis en évidence.^{36,47} La dette en oxygène active l'endothélium et l'inflammation

systémique.⁴⁸ Ainsi, on observe dans les premières minutes après la réanimation de l'AC, une augmentation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, TNF α), de récepteurs solubles (récepteur soluble au TNF type II) et d'endotoxines.⁴⁷ Il est probable que l'AC entraîne, comme le sepsis, une tolérance aux endotoxines à l'origine d'une immunodépression et d'une augmentation du risque d'infection nosocomiale.^{47,49} Très récemment, Venet *et al.* ont montré que l'expression monocyttaire de HLA-DR était diminuée à J1 et J3 après un AC réanimé et ceci de façon plus marquée chez les patients décédés que chez les survivants.⁵⁰

L'activation de la coagulation, associée à une activation insuffisante de la fibrinolyse, joue un rôle important dans la défaillance multiviscérale.^{51,52} On observe une activation des systèmes coagulation/anticoagulation, fibrinolyse/antifibrinolyse après la restauration d'activité circulatoire spontanée (RACS).⁵² Ainsi, les facteurs anticoagulants tels que les protéines S, C et l'antithrombine voient leurs taux diminués en même temps qu'est observée une augmentation transitoire de la protéine C activée endogène.⁵² Par ailleurs, les complexes thrombines-antithrombines ainsi que la fibrinolyse (complexe plasmine-antiplasmine) sont également activés.⁵² La génération de ROS, de cytokines, de produits de la coagulation, et l'activation du système du complément durant la reperfusion entraînent une activation des polynucléaires neutrophiles et une augmentation de l'expression de leurs molécules d'adhésion de surface.⁵³ L'adhésion leucocytaire à l'endothélium joue un rôle important dans la survenue des troubles de la perméabilité vasculaire et des micro-thromboses. Ces phénomènes sont à l'origine de la formation de microthrombi et de la formation de thrombine dans toute la microvascularisation de l'organisme ce qui participe aux lésions neurologiques et à la dysfonction myocardique décrits précédemment.

Enfin, comme dans le sepsis, l'AC peut entraîner des lésions de l'axe hypothalamo-hypophysaire entraînant une insuffisance surrénalienne.⁵³ L'insuffisance surrénalienne, tout comme celle observée dans le sepsis, pourrait participer au développement de l'état de choc après AC.

C - Prise en charge thérapeutique

Le tableau 2 résume les recommandations de prise en charge de l'AC.

1 - Hypothermie thérapeutique

Parce qu'elles sont le déterminant principal du pronostic d'un AC réanimé, prévenir la survenue des lésions cérébrales constitue l'enjeu thérapeutique prioritaire. L'hypothermie thérapeutique est le seul traitement adjuvant de la RCP à avoir démontré une amélioration du pronostic neurologique et de la survie chez les patients réanimés d'un AC. Nous développerons plus loin les nombreux mécanismes protecteurs de l'hypothermie thérapeutique. Son avènement en pratique clinique date de 2002 et fait suite à la publication de deux essais cliniques randomisés contrôlés que nous détaillerons également plus loin dans le chapitre consacré à l'hypothermie thérapeutique dans l'AC.^{54,55} Sur la base de ces résultats ainsi que de ceux d'une étude récente,⁹ les actuelles recommandations internationales concernant le contrôle thermique des patients victimes d'AC extrahospitaliers sont :^{39,56,57}

- le maintien d'une température corporelle cible constante entre 32°C et 36°C
- le contrôle thermique pour les patients victimes d'AC extrahospitaliers de rythme choquable qui restent inconscients après la RACS (recommandation forte)
- le contrôle thermique pour les patients victimes d'AC extrahospitaliers de rythme non choquable qui restent inconscients après la RACS (recommandation faible)
- une durée d'au moins 24 heures si un contrôle thermique est mis en place (recommandation faible).

2 - Autres traitements spécifiques

Les autres traitements (coenzyme Q10, thiopental, glucocorticoïdes, nimodipine, lidoflazine, diazépam) utilisés seuls ou avec l'hypothermie thérapeutique n'ont pas démontrés d'amélioration du pronostic neurologique après AC.⁵⁸⁻⁶³ Plus récemment, deux études françaises, prospectives, multicentriques et randomisées,

ont testé de nouveaux traitements pour améliorer le pronostic du syndrome post-AC. Sur la base des études expérimentales ayant démontré les effets protecteurs de l'EPO dans des contextes d'I/R, l'équipe de Cariou *et al.* a injecté de hautes doses d'érythropoïétine (EPO) durant les 48 premières heures chez les patients ayant présenté un AC de cause présumée cardiaque. Les 476 patients recrutés ont été randomisés dans un groupe avec injection d'EPO et un groupe contrôle. Aucune différence significative, ni sur le pronostic neurologique ni sur la mortalité, n'a été observée.⁶⁴ Notre équipe a testé l'injection pré-hospitalière de ciclosporine A (CsA) chez des patients ayant présenté un AC par rythme non choquable. Expérimentalement, par ses effets protecteurs mitochondriaux, la CsA avait démontré une prévention du syndrome post-AC. L'injection de CsA était réalisée en pré-hospitalier par les équipes médicalisées du SAMU. Après analyse des 67 patients vivants à 24 heures du groupe CsA et des 62 patients vivants à 24 heures du groupe contrôle, aucune différence significative sur l'amélioration des défaillances d'organes (score SOFA) à 24 heures n'était observée.⁶⁵ Une autre étude randomisée est actuellement en cours pour tester les effets protecteurs du NO inhalés chez des patients ayant présenté un AC extra-hospitalier.⁶⁶

3 - Mesures non spécifiques

En l'absence de nouveau traitement spécifique, les autres axes de prise en charge sont des mesures usuelles de prise en charge des lésions coronaires et de neuroprotection (figure 1). Ils concernent :

- Angioplastie coronarienne :

Le SCA représente de 59 à 71 % des AC de causes cardiaques.⁶⁷ Le bénéfice sur la survie d'une coronarographie pour diagnostiquer et traiter une occlusion coronaire est sujet à controverse. Ce bénéfice semble exister pour les patients présentant des anomalies ECG évoquant un SCA.⁶⁸ Ce bénéfice est beaucoup plus discuté pour les patients ayant présenté un AC sans cause cardiaque évidente,⁶⁹⁻⁷³ et doit être envisagé et se décider au cas par cas.³⁹

- Maintien de la perfusion cérébrale :

Compte tenu de l'altération de la perfusion cérébrale que nous avons décrite précédemment, lutter contre toute hypoperfusion cérébrale est nécessaire au regard

notamment de l'instabilité hémodynamique fréquente des patients. Ceci passe par le recours aux traitements vasopresseurs, notamment la noradrénaline, pour un maintien de la pression artérielle du patient dont la cible semble être pour la systolique 90mmHg et 65mmHg pour la moyenne.³⁹

- Contrôle des convulsions :

Près de 30% des patients comateux après la RACS vont présenter des convulsions. Celles-ci peuvent aggraver les lésions cérébrales et doivent donc être traitées par l'administration d'un traitement spécifique (valproate de sodium, levetiracetam, phénytoïne, benzodiazepines, propofol, ou un barbiturique).³⁹

- Contrôle ventilatoire :

Du fait de ses effets sur la perfusion cérébrale, la PaCO₂ doit être maintenue dans les valeurs physiologiques.³⁹ Si l'hypoxémie par l'hypoxie qu'elle entraîne est délétère, l'hyperoxie pourrait également aggraver le pronostic neurologique.⁷⁴⁻⁷⁷ Une cible de saturation artérielle en oxygène (SaO₂) entre 94 et 98% a été retenue.³⁹

- Contrôle de la glycémie :

Contrôler la glycémie souvent élevée chez les patients réanimés semble un objectif à suivre compte tenu des effets délétères de l'hyperglycémie sur les lésions cérébrales. Néanmoins, un contrôle stricte de la glycémie est également pourvoyeur d'un nombre plus élevé d'hypoglycémies très délétères sur les lésions cérébrales.⁷⁸ Il faut donc s'assurer de maintenir une glycémie inférieure à 10 mmol/L en évitant tout épisode d'hypoglycémie.⁷⁹

Tableau 2 - Recommandations internationales de l'ILCOR 2015 pour la prise en charge du syndrome post-AC (d'après ¹¹).

Action	Classe de recommandation	Niveau de preuve
Coronarographie		
STEMI post RACS	I	B-NR
Non-STEMI post-RACS	Ila	B-NR
Cibles thérapeutiques hémodynamiques		
PAS > 90 mmHg ou PAM > 65 mmHg	IIb	C-LD
Contrôle ciblé de la température		
ACEH-rythme choquable	I	B-R
ACEH-rythme non choquable	I	C-EO
Cible thérapeutique : 32-36°C	I	B-R
Durée du contrôle thermique : 24 heures	Ila	C-EO
Prévention de la fièvre	IIb	C-LD
Comitialité post-AC		
Réalisation d'une EEG précoce	I	C-LD
Traitement d'un état de mal	IIb	C-LD
Cibles thérapeutiques respiratoires		
PaCO ₂ : 35-45 mmHg	IIb	B-NR
SaO ₂ > 94%	Ila	C-LD
Contrôle glycémique	IIb	B-R

Niveau de preuve : A : méta-analyses et essais randomisés de haute qualité ; B-R : études randomisées ; B-NR : études non randomisées ; C-LD : données limitées ; C-EO : consensus d'expert.

Classe de recommandation : I : fort (bénéfice >>> risque) ; Ila : modéré (bénéfice >> risque) ; IIb : faible (bénéfice ≥ risque) ; III (avec niveau de preuve A ou B) : pas de bénéfice majeur (bénéfice = risque) ; III : dangereux (risque > bénéfice).

Abréviations : STEMI : sus-décalage du segment ST sur l'ECG après reprise d'une activité circulatoire spontanée ; RACS : restauration d'une activité circulatoire spontanée ; PAS : pression artérielle systolique ; PAM : pression artérielle moyenne ; ACEH : arrêt cardiaque extrahospitalier ; EEG : électroencéphalogramme.

Restauration d'une activité circulatoire spontanée et coma

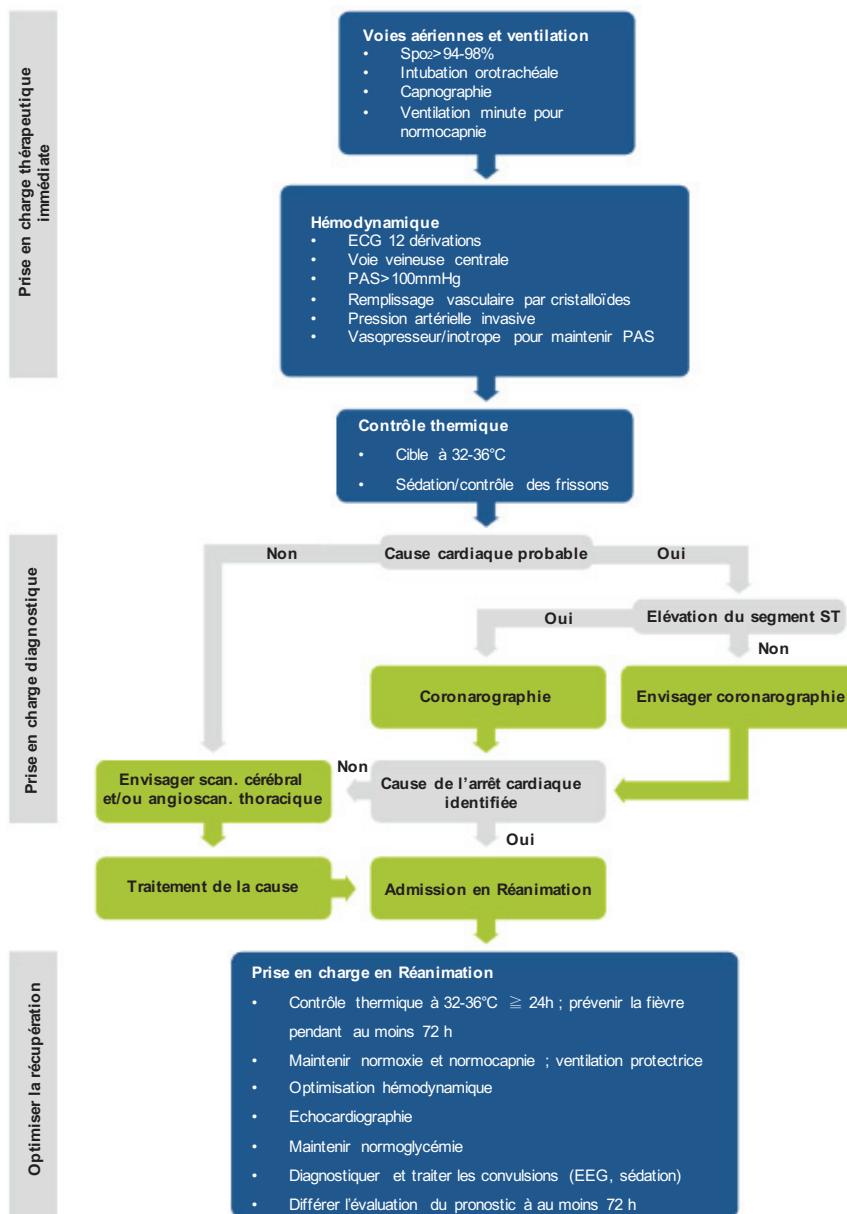


Figure 1 - Prise en charge de l'arrêt cardiaque réanimé (d'après ³⁹).

II - MITOCHONDRIES ET ISCHEMIE-REPERFUSION

A - Mitochondrie

Les mitochondries sont apparues il y a environ deux milliards d'années suite à l'enfouissement d'une α -protéobactérie par un précurseur de la cellule eucaryote moderne. Elles ont gardé une structure membranaire dédoublée ainsi que leur propre ADN distinct de l'ADN nucléaire. Il s'agit d'organites dynamiques capables de se scinder, de fusionner et qui ont d'étroites relations avec les autres organites cellulaires. Leur rôle est essentiel puisqu'elles sont responsables de la production de l'énergie utile à la cellule provenant de la dégradation des glucides et des acides gras convertis en ATP par la phosphorylation oxydative. La mitochondrie est également capable, en réaction à une agression cellulaire telle que l'I/R, d'orienter la cellule vers la nécrose ou l'apoptose par l'intermédiaire du phénomène de transition de perméabilité.

1 - Structure

La mitochondrie est un organite cytoplasmique dont la taille varie de 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large. Chaque mitochondrie est délimitée par deux membranes (interne et externe) hautement spécialisées qui ont des fonctions très différentes. Ensemble, elles créent deux compartiments mitochondriaux distincts : la matrice interne et l'espace intermembranaire beaucoup plus étroit.

- **La membrane externe** est une membrane classique et lisse qui entoure la mitochondrie et a une composition en protéines (60 %) et en lipides (40 %) proche de celle des membranes plasmiques eucaryotes. Elle est perméable grâce à la présence de canaux porines appelés *Voltage-Dependent Anion Channel* (VDAC). Ceux-ci forment un canal non spécifique qui laisse passer les molécules de petits poids moléculaires telles que des anions, des cations, différents métabolites (acides gras, pyruvate...) et des nucléotides. D'autres protéines appelées les *Translocase of the Outer Membrane* (TOM) permettent le transport actif des molécules de haut poids moléculaire comme les protéines du cytosol.

- **La membrane interne** est composée à 75% de protéines et 25% de lipides dont une proportion importante de cardiolipine. Elle est imperméable à toutes les molécules polaires et aux ions en particuliers les protons. Seules les petites molécules neutres telles que l'O₂, l'H₂O, le CO₂ et le NH₃ peuvent diffuser passivement. Des transporteurs très sélectifs sont donc présents pour assurer le passage des métabolites et des ions à travers la membrane interne. Enfin, elle possède de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales permettant d'augmenter sa surface et au sein desquelles se trouvent les complexes de la chaîne respiratoire.

- **L'espace intermembranaire**, situé entre les deux membranes, a une composition proche du cytosol du fait de la relative perméabilité de la membrane externe.

- **La matrice mitochondriale** est délimitée par la membrane interne. Elle contient le génome mitochondrial qui code essentiellement pour la synthèse des protéines de la membrane interne et les protéines régulatrices de la transcription de ce génome. La matrice contient également des enzymes impliquées dans le métabolisme (β -oxydation des acides gras, oxydation du pyruvate, cycle de Krebs...).

2 - Fonctionnement

2.1 - Phosphorylation oxydative

La mitochondrie stocke l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule sous la forme d'une liaison anhydride lors de la phosphorylation de l'adénosine diphosphate (ADP) en ATP. L'ensemble des réactions qui conduisent à cette synthèse d'ATP consomme de l'oxygène : on parle de respiration mitochondriale ou phosphorylation oxydative. La phosphorylation oxydative est la principale voie de formation d'ATP.

Les combustibles cellulaires résultant du métabolisme des nutriments (glucose, acides gras et acides aminés) sont oxydés pour fournir des coenzymes réduits : principalement la forme réduite du nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et en moindre mesure du flavine adénine dinucléotide (FADH₂). La chaîne respiratoire mitochondriale via ses différents complexes assure le transfert des électrons à hautes énergies issus du NADH et du FADH₂ jusqu'à l'oxygène. Chaque complexe de la

chaîne a une plus grande affinité pour les électrons que le complexe qui le précède jusqu'à l'oxygène, effecteur final, qui a la plus grande affinité. L'énergie ainsi libérée par le passage des électrons est utilisée par les complexes I, III et IV pour la translocation active des protons (H^+) de la matrice vers l'espace intermembranaire. L'espace intermembranaire devient donc chargé positivement et l'espace matriciel négativement ce qui crée un gradient électrochimique. La F_0-F_1 ATP-synthétase permet de convertir cette force protonmotrice en une énergie chimique via la phosphorylation d'ADP en ATP.

Des situations pathologiques ou des interventions pharmacologiques peuvent entraîner un découplage des phosphorylations oxydatives entraînant un effondrement du gradient électrochimique de protons qui diminue la force protonmotrice et augmente la vitesse de la respiration mitochondriale.

La chaîne respiratoire est constituée de cinq complexes protéiques (figure 2) :

- **Le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase)** oxyde le NADH + H^+ et transfère deux électrons sur l'ubiquinone réduite en ubiquinol. Ce transfert d'électrons est couplé à la translocation de quatre H^+ de la matrice vers l'espace intermembranaire.
- **Le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase)** oxyde le succinate en fumarate pour réduire du FAD^+ en $FADH_2$. L'oxydation du $FADH_2$ permet ensuite le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone. Cette réaction ne s'accompagne pas d'une translocation de protons à travers la membrane.
- **Le complexe III (ubiquinol-cytochrome c réductase)** oxyde l'ubiquinol en ubiquinone. Un total de quatre protons sera transloqué dans l'espace intermembranaire dont deux depuis la matrice. Les électrons sont transférés au cytochrome c.
- **Le complexe IV (cytochrome oxydase)** catalyse le transfert d'électrons du cytochrome c réduit produit par le complexe III à l'oxygène moléculaire. Cette réduction en deux molécules d' H_2O nécessite le transfert de quatre électrons issus de quatre protons pris depuis la matrice. Deux protons sont transloqués vers l'espace intermembranaire.

- **Le complexe V (F₀-F₁ ATP-synthétase)** est un large complexe protéique composé d'une portion transmembranaire (F₀) et d'un domaine hydrosoluble matriciel F₁. Il est possible de définir la F₀-F₁ ATP-synthétase comme un complexe de deux moteurs : un moteur F₁ entraîné par l'ATP et un moteur F₀ entraîné par des protons. Ils sont reliés par un arbre rotatif commun et leurs véritables sens de rotation sont opposés. Par ailleurs, son fonctionnement réversible est à l'origine d'une hydrolyse d'ATP en cas de chute de la force protomotrice ou d'une augmentation du rapport ATP/ADP.

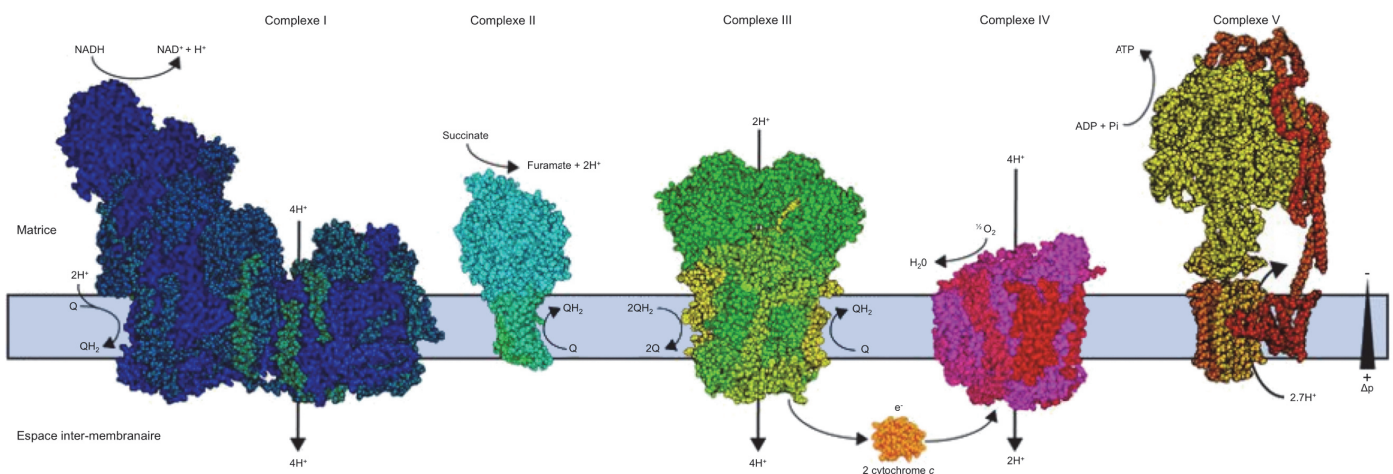


Figure 2 - Fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (d'après⁸⁰).

Les coenzymes réduits (NADH et FADH₂) issus du métabolisme des nutriments permettent de générer un flux d'électrons transféré le long de la chaîne respiratoire grâce à quatre complexes protéiques (I, II, III, et IV) et deux navettes (ubiquinone Q et cytochrome C) jusqu'à l'oxygène moléculaire. Les complexes I, III et IV sont également des pompes à protons qui permettent de faire sortir des H⁺ de la matrice vers l'espace intermembranaire créant un gradient électrochimique. La F₀/F₁ ATP-synthase (complexe V) convertit cette force protomotrice en ATP en faisant rentrer les protons dans la matrice.

2.2 - Production de radicaux libres de l'oxygène

Les radicaux libres sont, par définition, des espèces chimiques possédant un électron célibataire sur leur couche périphérique ce qui leur confère un fort degré de réactivité. Les ROS sont produits majoritairement dans la mitochondrie au cours, notamment, de la phosphorylation oxydative où une petite partie (2 à 4%) de l'oxygène échappe à une réduction complète en H₂O. Les ROS jouent un rôle majeur car ils sont impliqués dans les dégradations de l'ADN, des protéines ou des lipides mais également comme signal rétrograde vers le cytosol et le noyau. Le paradoxe des ROS

est qu'ils constituent des produits potentiellement toxiques du métabolisme mais sont en même temps des molécules essentielles à la signalisation et à la régulation cellulaire.

Il existe deux sites principaux de production de ROS mitochondriaux : le complexe I et le complexe III. L'appellation ROS inclut l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L'anion superoxyde est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet $O_2^{\cdot-}$ entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). L' H_2O_2 n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. Il est par ailleurs capable de donner naissance au radical hydroxyle $\cdot OH$ très réactif et délétère. La vitesse de production de ROS est fonction du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et du degré de réduction des transporteurs d'électrons.

Plusieurs systèmes enzymatiques et non enzymatiques permettent de lutter au niveau mitochondrial contre ces radicaux libres tels que la superoxyde dismutase mitochondriale (Mn-SOD), la glutathion peroxydase, le glutathion réduit, l'ubiquinone ou encore la vitamine E.

2.3 - Homéostasie calcique

La mitochondrie joue aussi un rôle majeur dans la régulation de l'homéostasie calcique notamment par son étroite relation avec le RE. Les mécanismes exacts de transport de calcium au sein de la mitochondrie font toujours l'objet d'intenses recherches. L'entrée de calcium dans l'espace intermembranaire se fait via le canal VDAC. Au sein de la membrane interne, deux voies permettent les flux de calcium : une voie d'entrée vers la matrice et dépendante du potentiel de membrane assurée par un canal appelé MCU (*Mitochondrial Calcium Uniporter*) et selon les tissus, une pompe $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ (NCLX) et un échangeur Ca^{2+}/H^+ (HCX) responsables de l'efflux de calcium depuis la matrice (figure 3).^{81,82} Le calcium joue un rôle clé dans la régulation des fonctions mitochondriales notamment dans le contrôle de la chaîne respiratoire, la production de ROS ou encore l'ouverture du PTP.

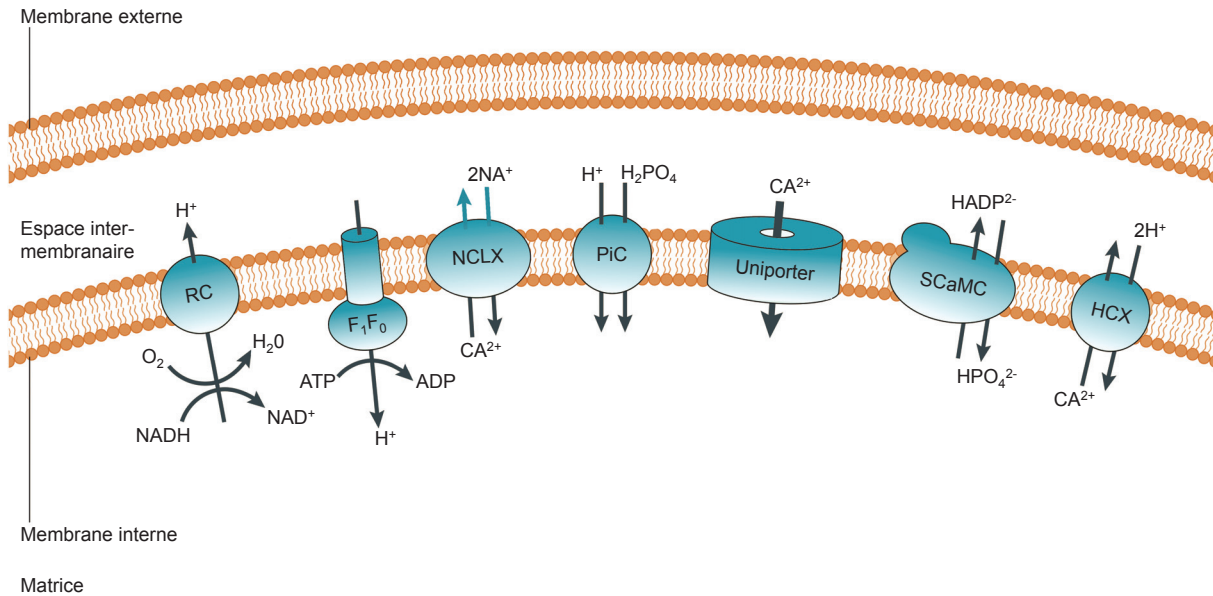


Figure 3 - Transport mitochondrial du calcium (d'après ⁸²).

La chaîne respiratoire (RC) est à l'origine du gradient électrochimique transmembranaire. L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) est le principal mécanisme d'efflux de calcium de la mitochondrie. L'uniporteur assure l'entrée du calcium grâce au potentiel de membrane. Un échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ assurerait également un efflux de calcium (HCX).

3 - Pore de transition de perméabilité mitochondrial

La transition de perméabilité est une augmentation brusque de la perméabilité aux solutés de la membrane mitochondriale interne entraînant une libre communication entre le cytosol et la matrice. La transition de perméabilité et son inhibition par les nucléotides de l'adénine sont connues depuis les années 50.^{83,84} En 1976, Hunter *et al.* avaient montré, sur des mitochondries isolées de cœur, qu'en présence de Ca^{2+} les mitochondries passaient d'un état condensé à un état gonflé.⁸⁵ Le terme « transition de perméabilité » a été introduit en 1979 par Haworth et Hunter qui ont fait l'hypothèse que ce phénomène était lié à l'ouverture d'un canal situé dans la membrane interne de la mitochondrie.^{86,87,87,88} Dès 1987, des auteurs identifient la ciclosporine A (CsA) comme puissant inhibiteur de ce phénomène permettant aux mitochondries d'accumuler des quantités de calcium bien supérieures à celles qui conduisent habituellement au gonflement de la mitochondrie et à la perméabilité de la membrane interne.⁸⁹ Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'électrophysiologie en *patch-clamp* sur des mitoplastes de mammifères qui ont révélés la présence d'un canal à haute conductance (≈ 1 nS) d'un diamètre proche de

3 nm,⁹⁰ appelé le *Mitochondrial Mega Channel* (MMC),⁹¹ et inhibé par la CsA.^{91,92} Le terme de MMC a progressivement laissé la place à celui de PTP. L'ouverture prolongée du PTP entraîne un gonflement de la matrice mitochondriale (*swelling*), un effondrement du potentiel de membrane, l'arrêt de la synthèse de l'ATP et son hydrolyse par l'ATP-synthétase, la libération de Ca²⁺, la déplétion des nucléotides, la rupture de la membrane mitochondriale externe et éventuellement la libération de protéines pro-apoptotiques telles que le cytochrome c. Une ouverture transitoire du PTP pourrait être impliqué dans la régulation physiologique de l'homéostasie calcique et des ROS,⁹³ et fournir aux mitochondries un mécanisme rapide de libération du Ca²⁺.⁹⁴

3.1 - Structure moléculaire

La structure moléculaire exacte du PTP est débattue depuis plus de 30 ans et fait toujours l'objet d'intenses recherches. On suppose qu'il s'agit d'un complexe multiprotéique assemblé à la juxtaposition des membranes internes et externe.⁹⁵ L'apport des modèles transgéniques a remis en cause plusieurs protéines proposées comme constitutives du pore démontrant qu'aucune n'était indispensable à la transition de perméabilité. Etant donné les incertitudes et les nombreuses recherches toujours en cours sur le sujet, nous aborderons les principales protéines qui semblent jouer un rôle dans la transition de perméabilité.

- ***Voltage-dependent cation channel (VDAC)*** est la principale protéine de la membrane externe mitochondriale dont la principale fonction est de permettre l'entrée de petites molécules hydrophiles dont le calcium. D'un poids moléculaire de 32 kDa, elle est formée de 19 feuillets β et d'une région α -hélicoïdale N-terminale située à l'intérieure du canal. Il en existe trois isoformes (VDAC1, VDAC2 et VDAC3) chez les mammifères. VDAC a été proposé comme constituant du PTP car il était historiquement isolé avec les protéines TSPO dont les ligands modifiaient les propriétés du MMC. De plus, il avait également une localisation proche des sites d'interactions entre les deux membranes mitochondriales. L'étude de mitochondries dépourvues de l'isoforme VDAC1 (réponse au calcium, inhibition par la CsA...) a démontré que celles-ci avaient pourtant les mêmes caractéristiques que les mitochondries issues de souris contrôles.⁹⁶ Des résultats similaires pour VDAC2 et 3

ont été obtenus.^{97,98} Compte tenu des résultats de ces expérimentations biochimiques et génétiques, il est désormais admis que VDAC n'est pas un constituant essentiel du PTP.

- **Transporteur des nucléotides adényliques (ANT)**, d'un poids moléculaire de 35 kDa, est la protéine la plus abondante de la membrane interne mitochondriale. Elle catalyse l'échange d'ADP entrant dans la matrice et d'ATP sortant de la matrice avec une stœchiométrie de 1:1. Son rôle dans la transition de perméabilité a d'abord été suspectée par une approche pharmacologique (l'atractyloside était capable d'induire une transition de perméabilité et de modifier la conformation de ANT).⁹⁹ De plus, ANT provenant de mitochondries de cœurs de bovins et reconstitué en protéliquesomes présentait une activité de canal de conductance stimulé par le Ca^{2+} et était inhibé par la CsA.^{100,101} Néanmoins, l'étude de mitochondries dépourvues de ANT1 et 2 isolées du foie d'animaux transgéniques mettait en évidence la persistance de l'ouverture du PTP ainsi qu'une sensibilité conservée à la CsA.¹⁰² D'autres études ont ensuite poussé plus loin l'étude de mitochondries issues d'animaux transgéniques et ont permis de conclure qu'ANT pouvait moduler le PTP mais n'était pas un constituant essentiel du PTP.¹⁰³

- **La cyclophiline D** fait partie des cyclophilines qui sont des protéines ubiquitaires dotées d'une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase. Elles sont donc impliquées dans la conformation et le repliement des protéines. La forme la plus abondante chez l'homme est la cyclophiline A située dans le cytosol. La CsA a pour propriété d'inhiber l'activité des cyclophilines. Les mammifères ont une forme particulière de cyclophiline située dans la mitochondrie appelée cyclophiline D (CypD), d'un poids moléculaire de 18kDa. La CypD est la cible mitochondriale de la CsA qui entraîne une inhibition de l'ouverture du pore.¹⁰⁴ Les modèles expérimentaux transgéniques ont permis de confirmer que les mitochondries dépourvues de CypD présentaient une diminution de la susceptibilité d'ouverture du pore se traduisant *in vitro* par une augmentation des doses de Ca^{2+} nécessaires pour obtenir son ouverture et son insensibilité à la CsA.¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ Néanmoins, la CypD est une protéine mitochondriale matricielle ce qui est en contradiction avec l'hypothèse qu'elle serait un constituant du PTP. De plus, l'ouverture du PTP est toujours possible chez les mitochondries dépourvues de CypD en présence de forte dose de calcium intracellulaire. Enfin, d'autres modulateurs du

PTP conservaient leurs effets même en l'absence de CypD. Par ailleurs, la CypD est susceptible de subir des modifications post-transcriptionnelles telles que l'acétylation sur sa lysine 166 ce qui favoriserait l'ouverture du PTP.¹⁰⁸ La sirtuine 3 est capable de déacétyler la CypD diminuant ainsi la susceptibilité d'ouverture du PTP.¹⁰⁸ D'autres modifications post-transcriptionnelles de la CypD sont connues comme la nitrosylation sur son résidu cystéine 203 et la phosphorylation sur ses résidus sérines/thréonines qui favorisent l'ouverture du PTP.¹⁰⁹⁻¹¹¹ L'ensemble de ces données suggère que la CypD est plutôt un régulateur de l'ouverture du PTP qu'un de ses constituants.

- **Le transporteur mitochondrial de phosphate inorganique (PiC)** est situé dans la membrane interne de la mitochondrie et joue un rôle essentiel en permettant l'entrée de Pi dans la mitochondrie pour permettre ensuite la synthèse d'ATP. Le taux de PiC détermine le taux de production d'ATP dans la mitochondrie. Des études biochimiques ont mis en évidence que la liaison de la CypD au PiC était corrélée à l'inhibition de l'ouverture du PTP notamment sous l'effet d'inhibiteurs communs.¹¹² Celles-ci et une série d'études biochimiques supplémentaires ont conduit à l'idée que PiC pourrait être un composant clé du PTP en coopération avec l'ANT.^{112,113} Là encore, des études génétiques ont permis de développer des mitochondries dépourvues d'une expression de PiC et n'ont montré aucune altération de la fonction du PTP.^{114,115} Enfin, des expériences avec patch-clamp avec le PiC actif reconstitué ont révélé une fonction du canal anionique avec une conductance moyenne faible et non affectée par l'ADP.¹¹⁶ Ces données permettent de conclure que PiC n'est pas un élément structurel clé du PTP.

- **Mitochondrial protein translocator (TSPO)**, d'un poids moléculaire de 18 kDa, a initialement été identifiée dans la membrane mitochondriale externe avec la particularité de lier des analogues des benzodiazépines et a donc été assimilée à un récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR). Des études plus récentes ont suggéré que la TSPO pourrait être impliquée dans le transport du cholestérol mitochondrial,¹¹⁷ et la régulation du PTP.¹¹⁸⁻¹²⁰ Les modèles expérimentaux d'animaux transgéniques ont infirmé cette hypothèse démontrant que la TSPO ne jouait aucun rôle ni dans la structure ni dans la régulation du PTP.¹²¹ Les ligands de la TSPO pourraient en fait avoir une action directe sur la F₀/F₁ ATP-synthétase.¹²²

- **Les protéines de la famille BCL-2** participent à la régulation de l'apoptose et de la perméabilité de la membrane externe de la mitochondrie. Néanmoins, les mitochondries dont les gènes codant certaines de ces protéines avaient été inactivés présentaient une baisse de la perméabilité de la membrane externe sans altération significative du fonctionnement du PTP.^{123,124}

- **Spastic paraplegia 7 (SPG7, paraplégine)** est une protéase dont la mutation est responsable d'une forme héréditaire de paraplégie spastique. Elle est assemblée avec une autre protéine (AFG3L) au sein de la membrane interne de la mitochondrie. La délétion du gène codant la SPG7 entraîne *in vitro* une baisse de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire et une augmentation de la production de ROS.¹²⁵ Une étude récente suggère que SPG7 jouerait également un rôle essentiel dans la formation et la régulation du PTP.¹²⁶ Les auteurs de cette étude ont d'abord étudié la capacité de rétention calcique (CRC) à partir de cellules humaines perméabilisées et traitées par des siRNA pour supprimer la translation de protéines mitochondriales. Parmi les protéines dont la suppression a modifié la susceptibilité d'ouverture du PTP, les auteurs ont retenu la SPG7 car celle-ci était immunoprécipitée avec la CypD et VDAC1. La suppression ensuite de l'expression de SPG7 entraînait une baisse de la susceptibilité d'ouverture du PTP.¹²⁶ Néanmoins, SPG7 pourrait n'être qu'un régulateur du PTP et d'autres études sont nécessaires pour préciser son rôle dans la transition de perméabilité.

- **F₀/F₁ ATP-synthétase (complexe V de la chaîne respiratoire)** assure la synthèse d'ATP en assurant le couplage de la réaction chimique $ADP + P_i = ATP$ à la translocation des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. Cette réaction est réversible et, en l'absence de protons, l'ATP est hydrolysée et les protons sont transférés vers l'espace intermembranaire. C'est une étude récente de Bernardi *et al.* qui a mis en évidence le rôle majeur de la F₀/F₁ ATP-synthétase dans la transition de perméabilité.¹²⁷ La F₀/F₁ ATP-synthétase est un complexe constitué d'un transporteur spécifique membranaire de protons (F₀) intégrée à la membrane interne ainsi que d'un domaine F₁ catalytique hydrophile relié à F₀ par des tiges centrales et périphériques dont OSCP (*oligomycin sensitivity binding protein*) (figure 4). OSCP pourrait être un élément clé des interactions avec la CypD et d'autres protéines agissant sur le PTP comme la sirtuine 3.¹²⁸ En 2009, Giorgio *et al.* ont mis en évidence une interaction

entre la CypD et la F_0/F_1 ATP-synthétase.¹²⁹ La liaison se fait sur OSCP et entraîne une baisse de l'activité catalytique de l'enzyme restaurée par la CsA.^{127,129} Soumis à un stress calcique notamment, la F_0/F_1 ATP-synthétase forme un canal de conductance élevée identique au PTP.¹²⁷ La modification de sous-unités de l'enzyme entraîne une résistance à l'ouverture du PTP.¹³⁰ Ces données ont fait de la F_0/F_1 ATP-synthétase une candidate sérieuse avec deux solutions proposées : l'une basant le PTP sur un monomère de l'enzyme et l'autre sur une conformation en dimère de la F_0/F_1 ATP-synthétase (figure 5).^{131,132} Néanmoins, une étude très récente vient une nouvelle fois relancer la question de la structure moléculaire exacte du PTP. En effet, les auteurs ont montré que des cellules n'exprimant pas la sous-unité C en anneau de la F_0/F_1 ATP-synthétase pouvaient néanmoins présenter les caractéristiques de l'ouverture du PTP.¹³³

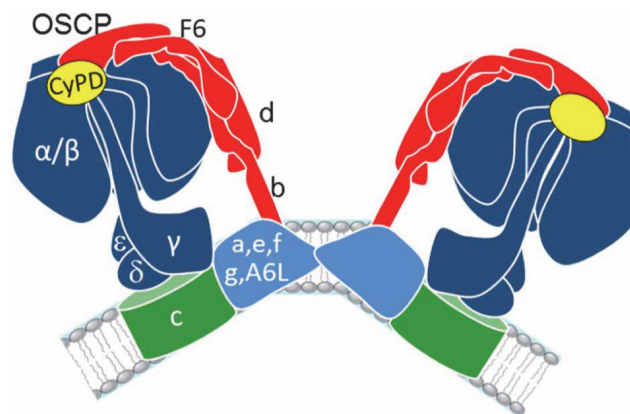


Figure 4 - Représentation schématique d'un dimère de la F_0/F_1 ATP-synthétase (d'après ¹³⁴).

F_1 et ses sous-unités (en bleu foncé), F_0 et ses sous-unités (en vert et bleu clair), en rouge les tiges périphériques

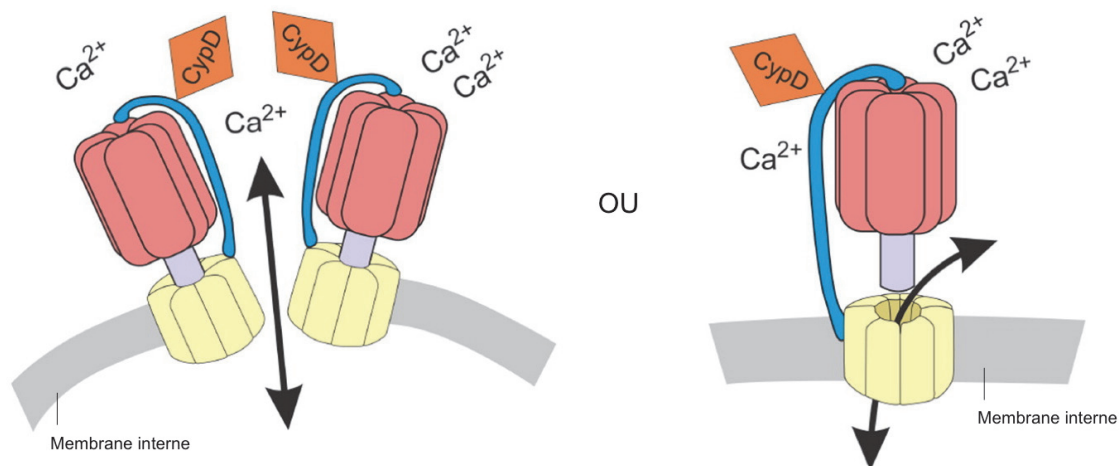


Figure 5 - Deux modèles de PTP proposés à partir de la F_0/F_1 ATP-synthétase (d'après ¹³¹).

Des dimères d'ATP-synthétase (A) pourraient former le PTP. Dans une autre hypothèse, le PTP serait un monomère de la sous-unité C en anneau de l'ATP-synthétase (B).

3.2 - Inhibition pharmacologique

L'intérêt croissant de la recherche pour l'inhibition du PTP dans des domaines aussi variés que l'I/R, la cancérologie ou les maladies neurodégénératives a permis la découverte d'un nombre de plus en plus importants d'inhibiteurs pharmacologiques dont les principaux sont listés dans le tableau 3. Alors que certains n'en sont qu'à un stade précoce de développement pharmacologique (exemple : phenylbenzamides), d'autres ont pu être testés expérimentalement *in vivo* (exemple GNX4728) ou même chez l'Homme (exemple : CsA, TRO40303). Dans un certain nombre de cas, les mécanismes d'action restent inconnus. La toxicité de certaines molécules en limite pour le moment leur expérimentation aux mitochondries isolées ou aux cellules.

Tableau 3 - Principaux inhibiteurs pharmacologiques du PTP (d'après ^{95,135,136}).

Inhibiteur du PTP	Cibles
2-aminoethoxydiphenyl borate	Inconnu
Acide bongkrelique	ANT
Acyl-CoA esters	ANT
ADP/ATP	ANT
Antamanide	CypD
C-9	CypD
Ciclosporine A	CypD
Debio-025	CypD
Diarylisoazole-3-carboxamides	Inconnu
DIDS	VDAC
ER-000444793	Inconnu
Glutamate	VDAC
GNX-865	Inconnu
GNX-4728	ANT, PiC ?
GNX-4975	ANT, PiC
Monoxyde de carbone	ANT
N-ethylmaleimide	ANT
N-phenylbenzamides	Inconnu
NADH/NAD+	VDAC
NIM811	CypD
Oligomycin	F1FO ATP-synthétase
Propofol	Antioxydant
Rasagiline	Inconnu
Rhodamine 6G	ANT
Ro 68-3400	ANT ou PiC
Ruthenium red	MCU
S15176	Inconnu
Sanglifehrin A	CypD
Sildenafil	Inconnu
TRO 19622	VDAC
TRO 40303	PBR
Ubiquinone(0)	ANT ou PiC

ANT : *Adenine nucleotide translocator* ; CypD : *Cyclophiline D* ; VDAC : *Voltage-dependant anion channel* ; PiC : *Transporteur du phosphate inorganique* ; NADH : *Nicotinamide adénine dinucléotide* ; MCU : *Mitochondrial calcium uniporter* ; PBR : *peripheral benzodiazepine receptor*.

B - Concept d'ischémie-reperfusion

L'ischémie est définie par une réduction ou par l'interruption du débit sanguin dans un territoire vasculaire donné, responsable d'une inadéquation entre les apports en oxygène et en substrats énergétiques d'une part, et les besoins de la cellule pour son fonctionnement et sa survie d'autre part. Elle se rencontre dans de nombreuses situations cliniques telles que l'IDM, l'AVC, l'ischémie mésentérique ou encore la transplantation d'organe qui correspondent à des interruptions complètes du flux sanguin. Les états de choc (cardiogénique, hémorragique, septique ou anaphylactique) entraînent également une ischémie par diminution partielle de la perfusion tissulaire liée à une insuffisance circulatoire aiguë. L'AC est un exemple particulièrement sévère d'ischémie puisque l'interruption complète du flux sanguin concerne tous les organes. La durée de l'ischémie est évidemment le premier déterminant des lésions cellulaires et la principale option thérapeutique pour le clinicien reste bien sûr de rétablir le flux sanguin le plus rapidement possible (angioplastie, thrombolyse, remplissage vasculaire, massage cardiaque, amines vasopressives...). Bien que salvatrice, la reperfusion peut engendrer elle-même des lésions que l'on appelle lésions de reperfusion (figure 6).³² Le concept de lésions de reperfusion a été décrit pour la première fois par Jennings en 1960 qui émet l'hypothèse, sur un modèle canin, que la reperfusion s'accompagnait d'une majoration du processus nécrotique.¹³⁷ Les auteurs ont proposé que la reperfusion était susceptible d'accélérer la progression de la nécrose mais sans provoquer de lésions *de novo*. C'est l'observation des effets protecteurs d'une intervention thérapeutique appliquée uniquement au début de la reperfusion (réduction de la taille de l'IDM) qui a permis d'admettre le concept de lésions *de novo* survenant au moment de la reperfusion.^{32,138}

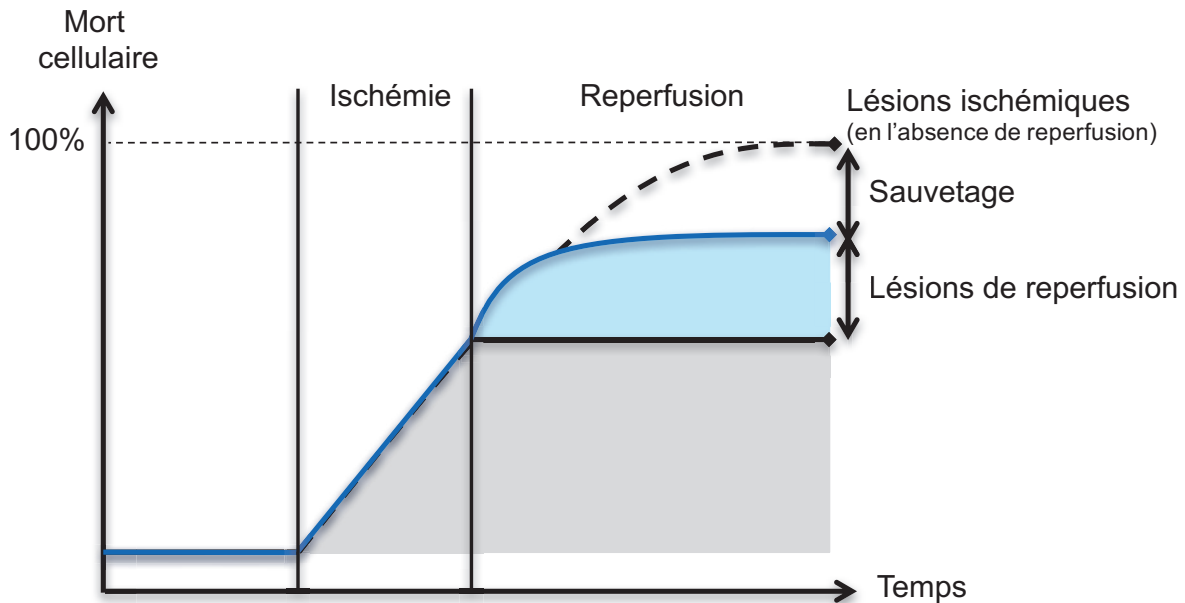


Figure 6 - Le concept de lésion de reperfusion (d'après ¹³⁹).

Au cours de l'ischémie apparaissent des lésions cellulaires irréversibles entraînant la mort des cellules de manière temps-dépendante. En l'absence de reperfusion, les lésions ischémiques vont aboutir à la nécrose cellulaire complète. La reperfusion arrête le processus de nécrose cellulaire ischémique mais à la phase précoce apparaissent des lésions supplémentaires, au-delà des lésions induites par l'ischémie. Ce sont les lésions de reperfusion

1 - Conséquences cellulaires de l'ischémie

Durant l'ischémie, l'hypoxie interrompt la phosphorylation oxydative entraînant une dépolarisation de la membrane mitochondriale et une déplétion en ATP. Ce processus est exacerbé par la dégradation de tout ATP disponible car la F_0/F_1 ATP-synthétase fonctionne en sens inverse pour maintenir le potentiel de membrane mitochondriale entraînant une hydrolyse de l'ATP et une augmentation du phosphate inorganique mitochondrial. Par ailleurs, le métabolisme cellulaire passe en glycolyse anaérobie, entraînant l'accumulation de lactate, ce qui réduit le pH intracellulaire. L'accumulation intracellulaire de protons active l'échangeur d'ions Na^+/H^+ qui évacue les protons de la cellule en échange d'une entrée de Na^+ . La surcharge sodique intracellulaire est également favorisée par l'arrêt de la pompe Na^+/K^+ ATP-dépendante. Cette accumulation de Na^+ intracellulaire va elle-même favoriser la surcharge calcique en activant l'échangeur Na^+/Ca^{2+} .

2 - Conséquences cellulaires de la reperfusion

- **La production de ROS** est majeure dès les premières minutes de la reperfusion. Le retour massif de l'oxygène dans un environnement jusque-là privé d'oxygène, couplé à la baisse d'ATP, favorise la production de ROS par augmentation de la fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire. L'accumulation de succinate semble jouer un rôle déterminant dans la production des ROS à la reperfusion car son oxydation entraîne un transport inverse d'électrons au niveau du complexe I mitochondrial.¹⁴⁰ L'oxydation de l'hypoxanthine, produit de dégradation de l'ATP, en xanthine puis en acide urique par la xanthine oxydase est également une importante source de production de ROS. Enfin, la NADPH oxydase et la NOS participent également à la production de ROS à la reperfusion.¹⁴¹ Les ROS vont entraîner des lésions de l'ADN, des protéines et des lipides cellulaires, une dysfonction endothéliale et une réaction inflammatoire systémique.

- **La surcharge en Ca^{2+} intracellulaire et mitochondriale** commence donc dès l'ischémie et est exacerbée au moment de la reperfusion en raison des lésions de la membrane plasmique, des lésions du réticulum endoplasmique induites par le stress oxydatif et de la reprise de l'activité mitochondriale. En effet, la ré-excitation mitochondriale permet la récupération du potentiel membranaire mitochondrial qui entraîne l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries via l'uniporteur mitochondrial Ca^{2+} .

- **La correction rapide du pH** va même jusqu'à une alcalose transitoire au moment de la reperfusion est la conséquence de la baisse du lactate et de l'activation notamment des échangeurs Na^+/H^+ et Na^+/Ca^{2+} favorisant la surcharge calcique.¹⁴²

3 - Principaux déterminants de l'ouverture du PTP à la reperfusion

- **La surcharge calcique** est le principal déterminant de la transition de perméabilité faisant partie de la définition du phénomène depuis sa première description.⁸⁵ Les mécanismes d'action de la surcharge calcique sur le PTP sont encore incomplètement élucidés. Dans l'hypothèse d'une conformation en dimère de la F_0/F_1 ATP-synthétase, le calcium agirait sur le site catalytique de l'enzyme pour induire un changement de

conformation de l'enzyme transmis par les tiges périphériques (dont OSCP) (figure 7).¹²⁸ Il semble probable que Ca^{2+} et les ions Mg^{2+} , Sr^{2+} et Mn^{2+} , qui diminuent les probabilités d'ouverture du PTP, se disputent les mêmes sites de liaison.

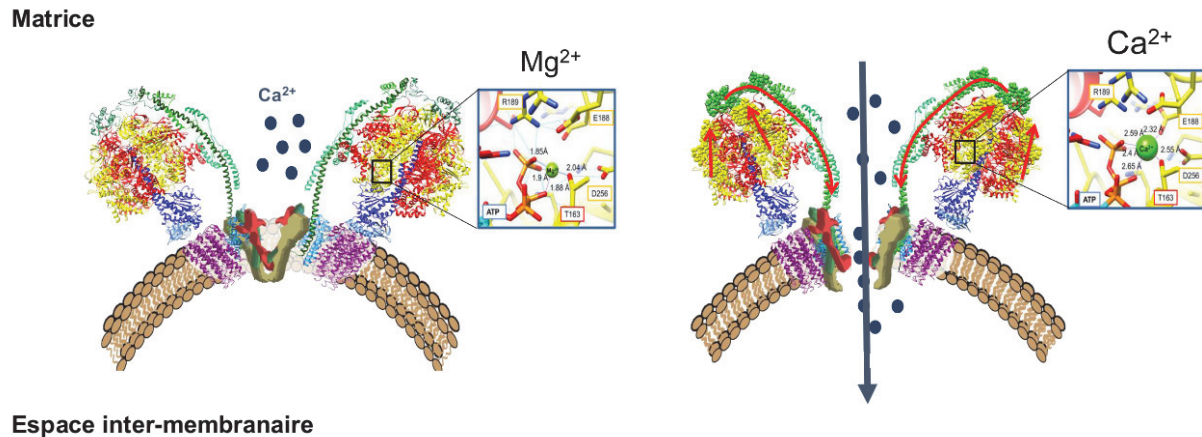


Figure 7 - Possible mécanisme d'action du calcium sur la F_0/F_1 ATP-synthétase à l'origine de la transition de perméabilité (d'après ¹²⁸).

La fixation du calcium sur le site catalytique de l'enzyme entraîne un changement de conformation transmis par les tiges latérales (en vert) permettant l'efflux de calcium. Le Mg^{2+} inhibe la transition de perméabilité.

- **La correction rapide de l'acidose** à la reperfusion favorise également l'ouverture du PTP. En effet, durant l'ischémie, le PTP reste fermé car l'acidose intracellulaire constitue un puissant inhibiteur de l'ouverture du PTP.^{99,143} L'inhibition par le pH acide se produit par protonisation réversible des résidus histidine.^{144,145} L'effet protecteur de l'acidose persiste chez les souris n'exprimant pas la CypD (CypD^{-/-}) suggérant que les résidus histidine ne sont pas localisés sur la CypD.¹⁰⁶ Comme nous l'avons vu précédemment, à la reperfusion, la correction rapide du pH va entraîner une amplification de la surcharge calcique elle-même facteur d'ouverture du PTP. Par ailleurs, le PTP peut également être affecté indirectement par le pH par le biais de composés dont l'accumulation est elle-même affectée par le pH. Par exemple, un pH externe acide augmente le taux d'absorption de Pi favorisant ainsi l'ouverture des PTP.¹⁴⁶

- **Le phosphate inorganique (Pi)** agit comme un inducteur de l'ouverture du PTP alors même que des concentrations croissantes de Pi diminuent la concentration en Ca^{2+} . Le Pi peut inhiber le PTP dans les mitochondries hépatiques de souris CypD^{-/-},

suggérant que les effets inducteurs de Pi peuvent dépendre au moins en partie de la liaison de CyPD.¹⁴⁷ Il est possible que certains des effets *in situ* de Pi soient provoqués par la formation de polyphosphate qui s'est révélé être un puissant activateur du PTP.¹⁴⁸

- **Les ROS** sont de puissants inducteurs d'ouverture du PTP, le métabolisme des ROS étant très connecté à celui du calcium. Dès 1973, une équipe avait pu observer, sur un modèle de cœur isolé-perfusé, un relargage massif d'enzymes myocardiques sous l'effet de la réoxygénation.¹⁴⁹ Comme nous l'avons déjà évoqué, les ROS augmentent les concentrations intracellulaires de Ca^{2+} notamment en modulant l'activité des récepteurs IP_3 sur le réticulum endoplasmique (RE) ainsi que les pompes et les canaux Ca^{2+} sur la membrane plasmique.¹⁵⁰ L'oxydation des groupements thiols des protéines de la membrane interne favorise l'ouverture du PTP.¹⁵¹ Les inductions transitoires d'ouverture du PTP pourraient déclencher de courtes rafales de ROS avec des fonctions de signalisation possibles via la modulation de chaperonnes et de kinases réalisant une amplification croissante de la production de ROS et de la surcharge calcique.¹⁵² Au-delà d'un certain degré d'augmentation incontrôlée des ROS dépassant les systèmes tampons, cela pourrait déclencher une ouverture prolongée du PTP et la mort cellulaire.¹⁵³

4 - Voies de mort cellulaire de l'ischémie-reperfusion

La mort cellulaire peut se définir comme une destruction irréversible de la membrane cellulaire. Il y a environ 50 ans, le premier concept de mort cellulaire régulée a été décrit et appelé apoptose.¹⁵⁴ Contrairement à la mort cellulaire régulée, la nécrose était considérée comme non régulée et non programmée. Depuis ces premières descriptions, de nombreux nouveaux concepts de morts cellulaires ont été introduits et décrits dans de très nombreuses études *in vitro* et *in vivo* et une nouvelle classification des différents types de mort cellulaire a été proposée en 2012.¹⁵⁵ La distinction entre ces différentes modalités de morts cellulaires est d'autant plus complexe que chacune de ces voies semblent être interconnectées.^{156,157}

Les principales modalités de mort cellulaires étudiées dans l'I/R sont la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.

4.1 - Nécrose

La nécrose est directement liée à la privation en oxygène et en nutriments des cellules. Elle se caractérise par un gonflement cellulaire et des organites, la rupture de la membrane plasmique et la perte du contenu intracellulaire incluant les organelles et des protéines pro-immunogènes (les *Damage Associated Molecular Patterns*, DAMPs). C'est classiquement un processus passif et non régulé. Il a été récemment montré que ce type de mort cellulaire peut également être un processus finement régulé (la nécroptose), différent de l'apoptose, faisant intervenir de nombreux stimuli extracellulaires dont le *Tumour necrosis factor* (TNF), *TNF receptor 1* (TNFR1) et les *Receptor Interacting Protein Kinase* (RIPK1 et RIPK3).¹⁵⁸ L'ouverture du PTP est également proposée comme un des mécanismes de la nécroptose.¹⁵⁹

4.2 - Apoptose

La reperfusion va conduire un certain nombre de cellules irrémédiablement lésées par l'ischémie vers la mort cellulaire par l'activation des voies de signalisation de l'apoptose qui est un phénomène actif. L'apoptose est un ensemble de mécanismes hautement régulés, coûteux sur le plan énergétique, réalisant un programme de mort prédéfini. Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose comprennent la condensation cellulaire, la fragmentation nucléaire, la condensation de la chromatine et le bourgeonnement des membranes pour former des corps apoptotiques. Les caspases orchestrent l'apoptose par le clivage de nombreuses protéines conduisant finalement à la reconnaissance phagocytaire et à la destruction de la cellule mourante. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle important de l'apoptose dans les lésions de reperfusion,¹⁶⁰ y compris dans l'AC.¹² Le signal intracellulaire de mort provient principalement de 2 voies qui convergent toutes les deux vers les caspases 3 et 7 (figure 8) :

- **Dans la voie intrinsèque**, la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, qui conduit à la libération de protéines pro-apoptotiques à partir de l'espace intermembranaire mitochondrial, est l'événement déterminant de l'activation de la caspase et de l'apoptose. Après sa libération des mitochondries, le cytochrome c se lie au facteur 1 d'activation apoptotique (APAF1), induisant son changement de

conformation et conduisant à la formation d'un complexe multiprotéique appelé apoptosome. L'apoptosome recrute et active la caspase 9, qui, à son tour, clive et active la caspase 3 et la caspase 7. Le perméabilisation est un processus hautement régulé, principalement contrôlé par des interactions entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille des BCL-2.

- **Dans la voie extrinsèque**, l'activation des récepteurs membranaires provoque le recrutement de molécules (FADD) qui activent une caspase initiatrice, la caspase 8. La caspase 8 activée clive et active directement les caspase 3 et 7.

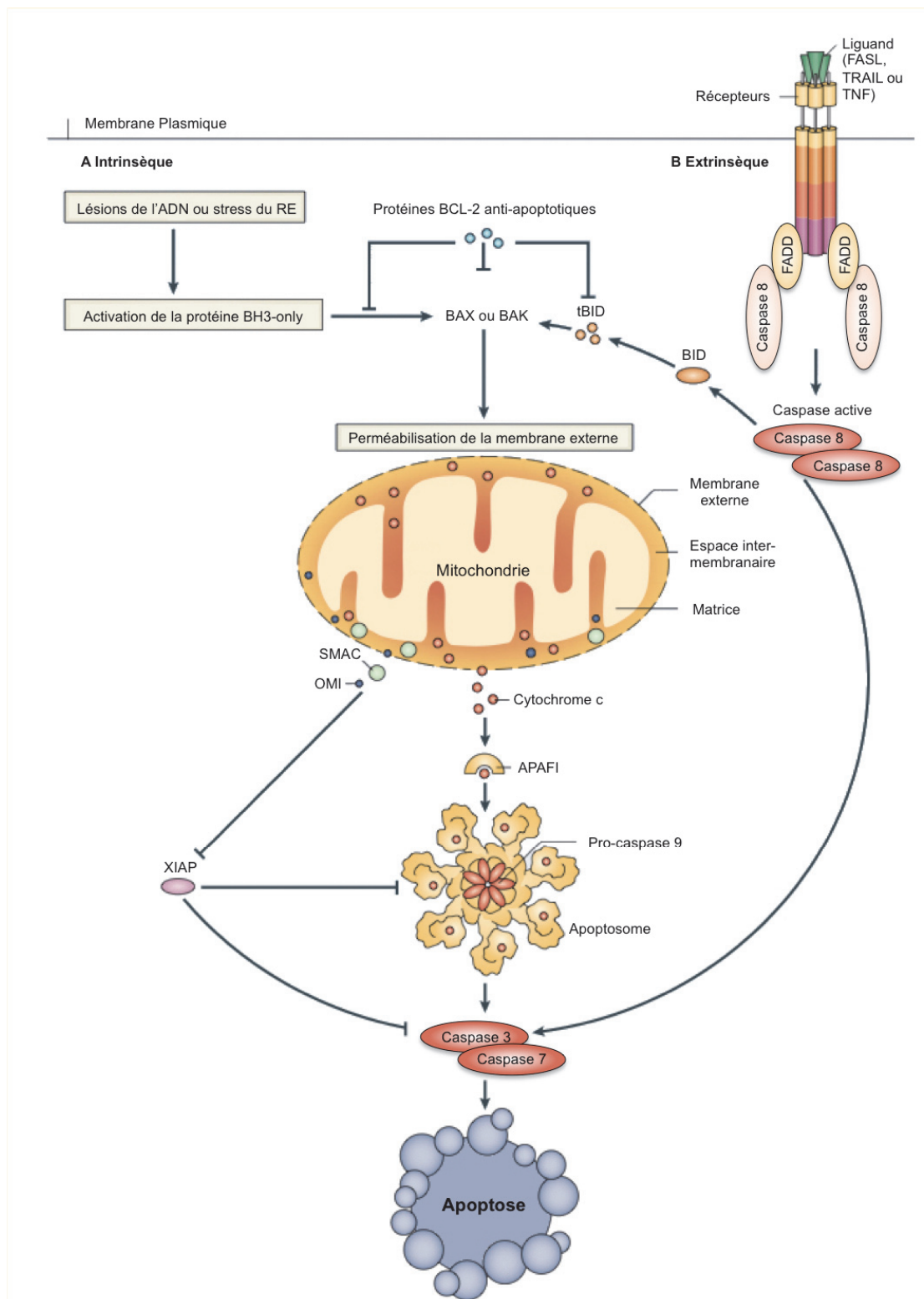


Figure 8 - Voies de signalisation de l'apoptose (d'après ¹⁶¹).

La voie apoptotique intrinsèque (A) : les stimuli, telles que les lésions de l'ADN ou les protéines en stress du réticulum endoplasmique (ER), activent les protéines *BH3-only*, conduisant à l'activation de *BCL-2-associated X protein* (BAX) ou *killer* (BAK) et à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. Les protéines BCL-2 anti-apoptotiques empêchent le perméabilisation en se liant aux protéines *BH3-only* et aux BAX ou BAK activés. Après la perméabilisation, la libération de protéines de l'espace

intermembranaire mitochondrial favorise l'activation de la caspase et l'apoptose. Le cytochrome c lie le facteur d'activation de la protéase apoptotique 1 (APAF1), induisant son oligomérisation, et formant ainsi une structure appelée apoptosome qui recrute et active la caspase 9. La caspase 9 clive les caspase 3 et 7 conduisant à l'apoptose. La libération mitochondriale de deux autres protéines (SMAC et OMI) neutralise la fonction inhibitrice de la protéine XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis protein*). **La voie apoptotique extrinsèque (B)** est initiée par la fixation de ligands sur leurs récepteurs, conduisant au recrutement de la protéine FADD (*FAS-associated death domain protein*) puis de la caspase 8. Il en résulte la dimérisation et l'activation de la caspase 8 qui peut alors cliver directement et activer la caspase 3 et la caspase 7, conduisant à l'apoptose. Le lien entre les voies extrinsèque et intrinsèque se crée par le clivage de la caspase 8 et l'activation de *BH3-interacting domain death agonist* (BID) dont le produit (BIDt) est requis dans certains types de cellules pour induire l'apoptose. FASL, *FAS ligand* ; TNF, *Tumour Necrosis Factor* ; TRAIL, *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*.

Le stress du réticulum endoplasmique (RE), qui intervient comme un des activateurs de la voie intrinsèque, correspond à une accumulation et une agrégation de protéines de conformation anormale au niveau du RE. Le RE est un lieu essentiel de synthèse et de maturation des protéines de la membrane plasmique, des organites intracellulaires et des protéines sécrétées par la cellule. Au cours de leur traduction, ces protéines pénètrent dans la lumière du RE où elles sont repliées et assemblées en complexes multiprotéiques. Le repliement de ces protéines requiert la participation de protéines chaperonnes résidentes du RE telles que GRP78 (*Glucose-Regulated Protein 78*, également appelée BIP). Dans certaines conditions cytotoxiques telles que celles rencontrées au moment de la reperfusion, la quantité de protéines de conformation anormale dans le RE augmente si fortement que cela sature l'équipement cellulaire en chaperonnes et en protéines de dégradation. Dans ces conditions, les cellules sont dites en situation de « stress du réticulum endoplasmique ». La réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) a alors pour but d'augmenter les capacités cellulaires d'élimination des protéines incorrectes. Elle peut aussi aboutir à la mort de la cellule par apoptose si le stress est trop intense ou de trop longue durée. Chez les mammifères, la réponse UPR est traduite par trois récepteurs transmembranaires situés au niveau du RE : la protéine *PKR-like ER Kinase* (PERK), l'*Activating Transcription Factor 6* (ATF6) et l'*Inositol Requiring Protein 1* (IRE1). Le stress du RE induit la dissociation de GRP78 de ces trois molécules ce qui active la transduction du signal UPR (figure 9).

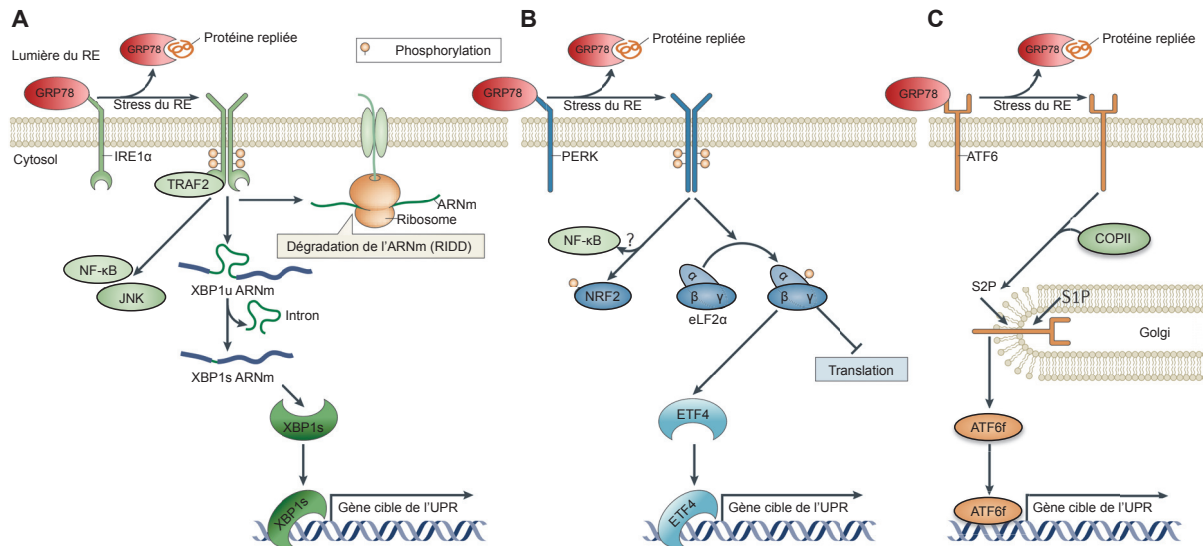


Figure 9 - Réponse UPR au stress du RE (d'après ¹⁶²).

Trois récepteurs membranaires assurent son initiation. La dimérisation de **IRE1 α** (A), suivie de l'auto-phosphorylation, déclenche son activité RNase qui traite l'ARNm codant pour la protéine XBP1u pour produire un facteur de transcription actif : XBP1 épissé (XBP1s). XBP1s contrôle la transcription des gènes codant pour les protéines impliquées dans le repliement des protéines, la dégradation dépendante du RE, le contrôle de la qualité des protéines et la synthèse des phospholipides. L'IRE1 α dégrade également certains ARNm par le biais d'une élimination régulée par l'IRE1 (*Regulated-IRE1 Dependent Decay*, RIDD). Après activation, **PERK** (B) phosphoryle eIF2 α pour atténuer la synthèse protéique générale et peut également phosphoryler NRF2, facteur de transcription impliqué dans le métabolisme redox. La phosphorylation de eIF2 α permet la traduction de l'ARNm ATF4, qui code un facteur de transcription contrôlant la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie, l'apoptose, le métabolisme des acides aminés et les réponses antioxydantes. **ATF6** (C) est transporté dans l'appareil de Golgi par interaction avec le complexe protéine COPII puis traité par S1P et S2P, libérant son fragment de domaine cytosolique (ATF6f). ATF6f contrôle la régulation positive des gènes codant les composants *ER-associated degradation* (ERAD) et aussi XBP1.

4.3 - Autophagie

L'autophagie est considérée comme un mécanisme de survie cellulaire, permettant un recyclage des protéines et des organites en réponse à une carence en nutriment. Elle conduit également à la mort cellulaire lorsqu'elle est dépassée. L'autophagie comprend quatre étapes distinctes et consécutives : l'initiation d'un croissant membranaire (phagophore) puis la formation d'autophagosomes (c'est-à-dire de structures à double membrane qui encerclent leur cargaison de constituants cytosoliques endommagés), la génération d'autolysosomes par amarrage et fusion avec les lysosomes et la dégradation finale avec un recyclage de la cargaison

séquestrée. Parmi les multiples complexes protéiques et voies de signalisation qui participent à l'organisation de ce processus, une cohorte de médiateurs clés a vu le jour. Ceux-ci incluent principalement mTOR, la phosphorylation de l'AMP (AMPK), la PI3-kinase et LC3-II.¹⁶³ Plusieurs études expérimentales ont montré que l'autophagie était activée lors d'une I/R.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ Néanmoins, son rôle protecteur ou délétère reste débattu.^{163,167,168} Certaines recherches ont pour but de développer des traitements capables de supprimer l'autophagie excessive sans éliminer l'autophagie basale.

5 - Concept d'ischémie-reperfusion et arrêt cardiaque

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'AC est une modalité extrême d'I/R globale. L'ischémie survient au moment de l'AC et la reperfusion débute dès les premières manœuvres de RCP. A titre d'exemple, les durées médianes d'ischémie (c'est à dire la durée d'AC avant la RCP) en France pour les AC extrahospitaliers sont d'une dizaine de minutes.^{65,169} Ces durées peuvent être beaucoup plus courtes dans les cas d'AC devant témoins.^{9,64,170} Si raccourcir la durée d'AC a resté un objectif de santé public important en favorisant par exemple la formation du grand public à la RCP ou la mise à disposition de défibrillateurs automatisés dans les lieux publics, comprendre les mécanismes des lésions de reperfusion et trouver des traitements pour en diminuer les conséquences est une voie de recherche prometteuse. A titre d'exemple, en 2012, à partir des connaissances acquises sur les conséquences cellulaires des phénomènes d'I/R, une équipe a mis en évidence des résultats spectaculaires sur un modèle d'ischémie cérébrale par ligature carotidienne chez le cochon. En effet, tous les animaux (n=11) qui avaient bénéficié d'une « reperfusion contrôlée » étaient vivants à 24 heures malgré un temps d'ischémie cérébral de 30 minutes. Le protocole de « reperfusion contrôlée » comprenait la perfusion, avant le déclampage carotidien, d'une solution dont la composition visait à limiter la surcharge calcique et le stress oxydant.¹⁷¹ Ainsi, remettant en cause le dogme selon lequel les lésions cérébrales seraient irréversibles au bout de quelques minutes d'ischémie, les auteurs apportaient la preuve qu'en contrôlant au maximum la reperfusion, les conséquences d'une ischémie globale même prolongée pouvaient être très significativement limitées. Ils laissaient même entrevoir, de façon contre-intuitive, de devoir différer une RCP pour permettre de limiter les lésions de reperfusion par un traitement préalable.

III - PROTECTION CELLULAIRE, MITOCHONDRIE ET ARRET CARDIAQUE

A - Conditionnement ischémique et pharmacologique

1 - Pré-conditionnement ischémique

Cela fait maintenant plus de trente ans que le principe du pré-conditionnement ischémique (PCI) a été décrit. Dans un article précurseur, Murry *et al.* ont montré que quatre cycles de 5 minutes d'ischémie avec une reperfusion intermittente permettaient de limiter la taille de l'infarctus de 75 %.¹⁷² Dans les années qui ont suivi, l'effet protecteur du PCI a pu être reproduit par tous ceux qui l'ont essayé et reproduit chez de nombreuses espèces, y compris chez l'homme, et confirmé dans d'autres organes.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Le PCI reste l'intervention la plus puissante pour réduire la taille l'IDM. Au cours des trois dernières décennies, plus de 10000 articles ont été publiés sur ce sujet et ont permis de mieux comprendre les mécanismes protecteurs induit par le PCI. En 1993, une équipe de chercheurs de Londres et une équipe d'Osaka ont montré qu'il existait une seconde fenêtre de protection plus tardive qui débute de 12 à 24 heures plus tard et persiste jusqu'à 72 à 96 heures mais offrant un cardioprotection moins puissante.^{176,177} Dans la première étude clinique de 1993, les auteurs ont réalisé un PCI dans une chirurgie de pontage coronarien par des épreuves de clampage/déclampage aortique et ont retrouvé une préservation des taux d'ATP après analyse de biopsies myocardiques.¹⁷⁸ Plus tard, une méta-analyse portant sur 22 essais incluant les données de 933 patients a montré que le PCI réduisait les arythmies ventriculaires, les besoins en inotropes et la durée de séjour en soins intensifs.¹⁷⁹ Néanmoins, les applications cliniques du PCI sont restées limitées principalement à cause de son caractère uniquement préventif.

2 - Post-conditionnement ischémique

En 2003, Zhao *et al.* découvrent que le myocarde peut être protégé des conséquences de l'infarctus par de brefs épisodes d'I/R réalisés juste après une

ischémie coronaire et ceci de manière comparable à la protection obtenue par le PCI.¹⁸⁰ La réduction de la taille de l'infarctus était alors de 44% dans ce modèle chez le chien. Le terme de post-conditionnement avait été inventé plusieurs années plus tôt, en 1996, par Na *et al.*, pour décrire le phénomène, dans des cœurs de félins, par lequel une reperfusion intermittente induite par des battements ventriculaires prématurés empêchait une fibrillation ventriculaire induite par la reperfusion.¹⁸¹ Comparé au stimulus du PCI, qui comprend un à quatre cycles d'ischémie brève et de reperfusion (le plus souvent d'une durée de 5 minutes), le stimulus du post-conditionnement ischémique (PostCI) est de courte durée et consiste en trois à six cycles d'ischémie et de reperfusion (d'une durée de 5 à 60 secondes). Dans le PCI, de brefs épisodes d'ischémie et de reperfusion sont nécessaires pour induire un changement dans la fonction mitochondriale, alors que, dans le PostCI, c'est probablement la reperfusion intermittente qui constitue l'aspect le plus important du protocole.¹⁷⁴ L'efficacité du PostCI pour réduire la taille de l'infarctus a ensuite été démontré chez de nombreuses espèces animales ainsi que chez l'homme même si son effet semble moins puissant que celui du PCI.^{174,175,182} Notons que la fenêtre de cardioprotection fournie par le PostCI se limite aux premiers instants de la reperfusion.

3 - Conditionnement ischémique à distance

En 1993, Przyklenk *et al.* montrent qu'un PCI appliqué sur un territoire vasculaire coronarien donné prévient également les lésions de reperfusion dans un autre territoire vasculaire.¹⁸³ Par la suite, des études ont montré que la taille de l'infarctus pouvait être réduit par de brefs épisodes d'I/R appliqués à l'intestin grêle,¹⁸⁴ ou même au niveau d'un membre.¹⁸⁵ La découverte du per-conditionnement à distance est plus récent. En 2007, Schmidt *et al.* montrent que 4 cycles de 5 minutes d'I/R appliqués au membre inférieur d'un porc pendant une ischémie myocardique limitent significativement la taille de l'infarctus et préservent la fonction ventriculaire gauche.¹⁸⁶ Le PostCI à distance a été décrit en 2005 pour la première fois. Kerendi *et al.* avaient réalisé des épreuves d'occlusion/désocclusion de l'artère rénale en fin d'ischémie myocardique et retrouvaient une réduction de la nécrose myocardique de 50%.¹⁸⁷ Ces résultats ont ensuite été retrouvés dans d'autres modèles animaux et à partir d'autres organes.^{188,189} Dans une très récente méta-analyse analysant 13 études cliniques, les

résultats montraient que le PostCI à distance appliqué à l'IDM permettait de réduire les taux de créatine kinase (CK) et de troponine, ainsi que la mortalité.¹⁹⁰

4 - Conditionnement ischémique et arrêt cardiaque

Cela fait presque 20 ans que des auteurs ont appliqué pour la première fois le concept de conditionnement ischémique à l'AC. En 2000, une équipe s'est intéressée aux effets du PCI sur un modèle d'AC chez le rat et a constaté des effets cardioprotecteurs et une amélioration de la survie des animaux.¹⁹¹ Il s'agissait d'un PCI par 2 brefs épisodes de FV (1 min) séparés par une durée de reperfusion de 10 minutes (2 cycles).

En 2012, Segal *et al.* ont appliqué le concept de PostCI à l'AC.¹⁹² Sur un modèle d'AC par FV chez le cochon, les auteurs ont réalisé 4 pauses de 20 secondes durant les 3 premières minutes de RCP. L'étude a conclu à une amélioration de la fonction VG à 1 heure et 4 heures post-AC ainsi qu'une amélioration neurologique des animaux à 48 heures. En 2015, Bartos *et al.* publient les résultats du PostCI appliqué à un modèle d'AC chez le cochons.¹⁹³ Dans ce modèle d'AC par FV, en plus de l'administration de deux molécules limitant les lésions de reperfusion, le massage cardiaque était modifié avec des temps de pause de 20 secondes entre deux cycles de massage de 20 secondes. Les auteurs ont observé un syndrome post-AC moins marqué chez les animaux qui avaient bénéficié du PostCI. La même équipe montrait récemment que ces effets protecteurs du PostCI étaient également observés en l'absence d'injection d'adrénaline, simulant ainsi les conditions de la RCP non médicalisée.¹⁹⁴

Des 2006, une équipe rapportait les effets neuroprotecteurs (résultats histologiques) d'un PCI à distance dans un modèle d'AC asphyxique chez le rat.¹⁹⁵ Le PCI à distance était également protecteur dans un modèle d'AC hypothermique chez le cochon.¹⁹⁶ En 2015, deux équipes ont rapporté les effets du PostCI à distance sur des modèles d'AC chez l'animal. Dans la première étude, les auteurs ont réalisé 4 cycles de 5 minutes d'occlusion fémorale bilatérale 10 min après la RACS sur un modèle d'AC par FV chez le cochon.¹⁹⁷ L'étude mettait en évidence une diminution significative des taux de LDH, CPK et Troponine Ic à 4 heures de reperfusion chez les animaux conditionnés par rapport aux animaux contrôles. Dans la seconde étude, il s'agissait d'un modèle d'AC par FV chez le rat sur lesquels les auteurs ont testé un pré-conditionnement (40 minutes avant l'AC) dans un groupe et un PostCI (5 minutes après l'AC) à distance

(4 cycles de 5 minutes d'ischémie suivi de 5 minutes de reperfusion à l'aide d'un brassard à pression sur le membre inférieur) dans un autre groupe. L'étude concluait à une amélioration significative (et équivalente entre les deux groupes) de la fonction cardiaque, de la survie et de l'examen neurologique à 72 heures chez les animaux conditionnés.¹⁹⁸ De façon intéressante, la même équipe montrait l'année suivante que le PostCI à distance et l'hypothermie thérapeutique avaient des effets protecteurs additifs.¹⁹⁹

L'ensemble de ces études expérimentales a permis de transposer les connaissances des phénomènes d'I/R et des stratégies thérapeutiques qui en découlent issues initialement des expérimentations *in vitro* ou de modèles d'ischémie focale (AVC, IDM) à une ischémie globale qu'est l'AC.

5 - Mécanismes protecteurs impliqués

Les voies de signalisations intracellulaires mises en jeu par le conditionnement ischémique sont nombreuses et remarquablement complexes (figure 10). Des milliers d'études ont rapporté plus de 100 molécules de signalisation et de très nombreux mécanismes de conditionnement différents et ceci dans de nombreux protocoles expérimentaux (structures sous-cellulaires isolées comme les mitochondries, cardiomyocytes isolés exposés à l'hypoxie/réoxygénation, lignées cellulaires de cardiomyoblastes, cardiomyocytes fraîchement isolés, coeurs isolés perfusés avec une ischémie globale ou régionale etc...). De nombreuses voies de protection sont communes au PCI, PostCI et PostCI à distance. On peut classer les intervenants en inducteurs, médiateurs (modification intracellulaire) et effecteurs. Cependant, cette classification reste schématique car certains cumulent les trois fonctions.

5.1 - Inducteurs

- Inducteurs physiques :

l'étirement myocardique active les canaux du sarcolemme, la signalisation en aval (adénosine, protéine kinase C et canaux potassique) et réduit la taille de l'IDM.²⁰⁰

- Inducteurs chimiques :

les stimuli chimiques libérés de manière endogène qui induisent une cardioprotection comprennent de petites molécules telles que les ions calcium, les ROS, les radicaux libres de l'azote, le sulfure d'hydrogène. Les ions calcium extracellulaires semblent jouer un rôle dans les phénomènes de conditionnement ischémiques mais probablement de façon mineure.^{201,202} Les ROS ont un rôle ambivalent dans les phénomènes de conditionnement : alors qu'une formation excessive de ROS contribue à des lésions irréversibles, une production modérée de ROS est protectrice probablement en oxydant des kinases protectrices.²⁰³⁻²⁰⁵ Les radicaux libres azotés, notamment le NO, partagent également ces effets différentiels dose-dépendant,²⁰⁶ et sont impliqués, selon leurs origines, dans le PCI, le PostCI et le PostCI à distance.^{207,208} Plus récemment, des molécules gazeuses autres que le NO ont également été étudiées pour leurs actions cardioprotectrices comme le sulfure d'hydrogène et le monoxyde de carbone.²⁰⁹

- Autacoïdes :

en 1991, *Liu et al.* ont montré que la perfusion d'adénosine ou d'un agoniste sélectif du récepteur A₁ de l'adénosine dans les artères coronaires pendant 5 minutes avant l'occlusion d'une branche coronaire permettait d'obtenir une cardioprotection similaire à celle fournie par le PCI. À l'inverse, un antagoniste des récepteurs de l'adénosine bloquait complètement les effets protecteurs du PCI mais n'avait aucun effet en l'absence de PCI.²¹⁰ Les récepteurs à l'adénosine A_{2A} couplés aux protéines G_s activent l'adénylate cyclase et la protéine kinase A et sont impliqués dans le PostCI. Les récepteurs A₁ et A₃ jouent quant à eux un rôle dans le PCI. L'adénosine active également la protéine kinase C (PKC) et en aval la voie RISK (*Reperfusion Injury Salvage Kinase*) ainsi que la voie NOS/protéine kinase G (PKG).²¹¹ Il a été montré que plusieurs récepteurs couplés aux protéines G dans le cœur peuvent imiter le PCI.²¹² La bradykinine, impliquée dans le PCI, le PostCI et le PostCI à distance active un

récepteur couplé à une protéine G_i et active également la voie RISK et la voie NOS/PKG.²¹¹

- Neurotransmetteurs et hormones :

L'acétylcholine,^{212,213} l'angiotensine,^{214,215} les catécholamines,^{216,217} l'endothéline,^{218,219} et les opioïdes,²²⁰ peuvent induire une cardioprotection en activant leurs récepteurs respectifs. Ces récepteurs agissent de manière additive et le blocage d'un sous-type de récepteur unique augmente le seuil ischémique de protection sans abolir la réponse au PCI.

- Cytokines :

Le $TNF\alpha$ agit dans le PCI via le récepteur TNFR2 (*Tumor Necrosis Factor Receptor 2*), STAT 3 et les canaux potassiques mitochondriaux ATP-dépendant (mitoK_{ATP}).²²¹⁻²²³ L'interleukine 6 (IL-6) agit via STAT 3.²²⁴

5.2 - Médiateurs

De nombreux médiateurs ont été identifiés pour expliquer les mécanismes du conditionnement ischémique. L'importance de ces différentes voies est débattue et semble dépendre des espèces, des modèles et des protocoles utilisés.

- Protéine kinase C :

Le rôle de la PKC a été proposé en 1994.²²⁵ Les auteurs ont montré que des antagonistes de la PKC inhibaient les effets du PCI. La PKC interagit avec d'autres kinases dont la tyrosine kinase et présente plusieurs isoformes de PKC aux fonctions différentes dans le PCI et le PostCI.^{226,227}

- Mitogen-Activated Protein Kinases :

Le terme *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK) regroupe une famille complexe de protéines kinases dont la propriété est de phosphoryler leurs substrats protéiques.²²⁸ La protéine p38 joue un rôle majeur dans le PCI.²²⁹ et possède plusieurs isoformes aux fonctions différentes ce qui peut expliquer l'échec clinique d'un inhibiteur non isoforme-spécifique de p38.²³⁰ Le rôle de ERK (*Extracellular-signal-Regulated Kinase*) dans le PCI est controversé.^{231,232}

- NO et protéine kinase G :

La NOS est activée par une protéine G dont la transduction du signal dépend de PI3K et Akt notamment. Le NO va entraîner la formation de GPMc qui active à son tour la PKG impliquée dans le PCI et le PostCI et dont la cible semble être les canaux mitoK_{ATP}.²³³⁻²³⁵

- Reperfusion Injury Salvage Kinase pathway (RISK) :

Depuis 2002 et l'introduction du concept d'une voie de survie cellulaire impliquant des kinases, la voie RISK a fait l'objet de très nombreuses publications. Tong *et al.* ont été les premiers à démontrer que le PCI activait PI3K (*Phosphatidyl inositol 3-OH kinase*) et Akt (*Serine/Threonine Kinase B*) et que la wortmannine, un inhibiteur de PI3K, inhibait ses effets protecteurs.²³⁶ Dans le cadre du PostCI, Yellon *et al.* ont démontré que l'activation pharmacologique de PI3K, Akt et ERK à la reperfusion réduisait la taille de l'IDM de 40 à 50%.²³⁷ La fixation de l'adénosine à son récepteur active PI3K, Akt, ERK et GSK3 β (*Glycogen Synthase Kinase 3 β*) lors du PCI.^{236,238,239} GSK3 β serait le point de convergence de la voie RISK et agirait sur le PTP,^{240,241} bien que son rôle exact reste controversé.

- Sphingosine kinase :

La Sphingosine kinase (SPhK) qui génère la sphingosine-1-phosphate (S1P) régule la mitose, l'apoptose, l'ultrastructure du cytosquelette et la survie cellulaire.²⁴² Une équipe a montré que les souris dépourvues de SPhK présentaient des infarctus de taille plus étendue, étaient résistantes au PostCI et n'activaient pas Akt et ERK en réponse au PostCI.²⁴³

- Survivor Activating Factor Enhancement pathway (SAFE) :

L'activation de la voie JAK-STAT (*Janus Kinase-Signal Transducers and Activators of Transcription*) est un médiateur du conditionnement ischémique indépendant mais en lien avec la voie RISK.²⁴⁴ L'équipe de Lecour a proposé l'acronyme SAFE et son équipe ainsi que celle de Opie *et al.* ont mis en évidence que les souris STAT 3-KO n'étaient plus protégées par le PCI.^{245,246} Le TNF α et son récepteur TNFR2 sont des inducteurs de cette voie.²²¹ Ainsi les mécanismes protecteurs du PostCI et probablement ceux du PostCI à distance impliquent la voie SAFE.^{223,247} La voie SAFE et la voie RISK convergent toutes les deux vers la mitochondrie.²¹¹

- Protéines kinases :

D'autres protéines kinases telles que la PKA sont probablement impliquées dans le PCI. La PKA active les NOS endothéliales augmentant la production de NO durant le PCI.²⁴⁸ La kinase AMP (AMPK) intervient dans les mécanismes protecteurs du PCI et l'activation des canaux K_{ATP} .^{249,250}

- Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF1 α) :

Le rôle de HIF1 α dans le PCI, protéine essentielle dans l'adaptation des cellules à l'hypoxie, a été démontré sur des souris génétiquement modifiées,²⁵¹ et semble avoir le PTP pour cible.²⁵²

5.3 - Effecteurs

La principale cible des mécanismes induit par le conditionnement ischémique est la mitochondrie (Figure 11)

- PTP :

L'équipe d'Ashraf est la première à suggérer en 2001 que le PTP pourrait être l'effecteur final du PCI.²⁵³ Par la suite, Hausenloy *et al.* ont montré que l'inhibition du PTP par la CsA mimait les effets du PCI tandis que son ouverture pharmacologique les inhibait.²⁵⁴ Dans notre laboratoire, Argaud *et al.* ont montré pour la première fois sur un modèle d'IDM chez le lapin que le PCI ainsi que la CsA limitaient la nécrose myocardique.²⁵⁵ Ainsi le PTP semble être un effecteur majeur car le PCI réduit son ouverture,²⁵⁶ et ses inhibiteurs pharmacologiques miment les effets du PCI et du PostCI,^{257,258} y compris chez l'homme,²⁵⁹ même si son application clinique est désormais remise en cause.²⁶⁰

- Canaux K_{ATP} :

C'est en 1992 que les canaux potassiques ATP-dépendants (K_{ATP}) ont été identifiés comme cible de molécules cardioprotectrices,^{261,262} puis deux ans plus tard comme impliqués dans les mécanismes du PCI.^{263,264} La structure exacte $mitoK_{ATP}$ est toujours incertaine mais semble être un complexe et multiprotéique.^{265,266} Le NO, la PKC et la PKG activent les $mitoK_{ATP}$ qui, par l'intermédiaire de ROS, activent la PKC.^{267,268} L'effet protecteur de ces canaux est également attribué à une stabilisation de la membrane

interne ainsi qu'à une prévention du découplage de la phosphorylation oxydative.⁹⁹ Ces canaux sont impliqués aussi bien dans le PCI que dans le PostCI mais aussi dans le PostCI à distance.²⁶⁹ L'implication probable des canaux K_{ATP} a également été évoqué sur un modèle d'AC puisqu'en 2000, des auteurs ont mis en évidence la disparition des effets protecteurs du PCI lorsque les animaux ont été traités par un bloqueurs des canaux K_{ATP} (glibenclamide).¹⁹¹

- Connexine 43 (Cx 43) :

La connexine 43 (Cx43) est une protéine de jonction communicante (« *gap junction protein* ») du sarcolemme qui est impliquée dans les mécanismes protecteurs du PCI.^{270,271} Le PCI provoque la translocation de Cx43 dans la mitochondrie. Cx43 va ensuite contribuer à l'entrée de potassium, à l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire et à la production d'ATP.²⁷²

- Hexokinase :

L'hexokinase est une enzyme cytosolique qui catalyse la réaction de phosphorylation des hexoses sur leur sixième carbone. Il s'agit de la première enzyme de la glycolyse. La fixation de l'hexokinase 2 à la mitochondrie est cardioprotectrice notamment via le PTP alors que sa dissociation entraîne le relargage du cytochrome c de l'espace intermembranaire. Par ailleurs, la voie RISK entraîne la fixation de l'hexokinase 2 à la mitochondrie.^{273,274}

- Nitrosylation des protéines :

Le NO est une molécule essentielle dans le PCI, le PostCI et le PostCI à distance. Le NO est capable de cibler directement des protéines pour modifier leurs structures et leurs fonctions. Ce processus est impliqué dans les mécanismes protecteurs du conditionnement ischémique.^{208,275,276}

- Stress du RE :

La translocation nucléaire d'ATF6 et ATF3 (cf précédemment) est augmentée par le PCI et la suppression génétique d'ATF3 empêche la réduction de la taille de l'IDM par le PCI tardif.⁵⁶ Le PostCI semble activer également l'UPR.²⁷⁷

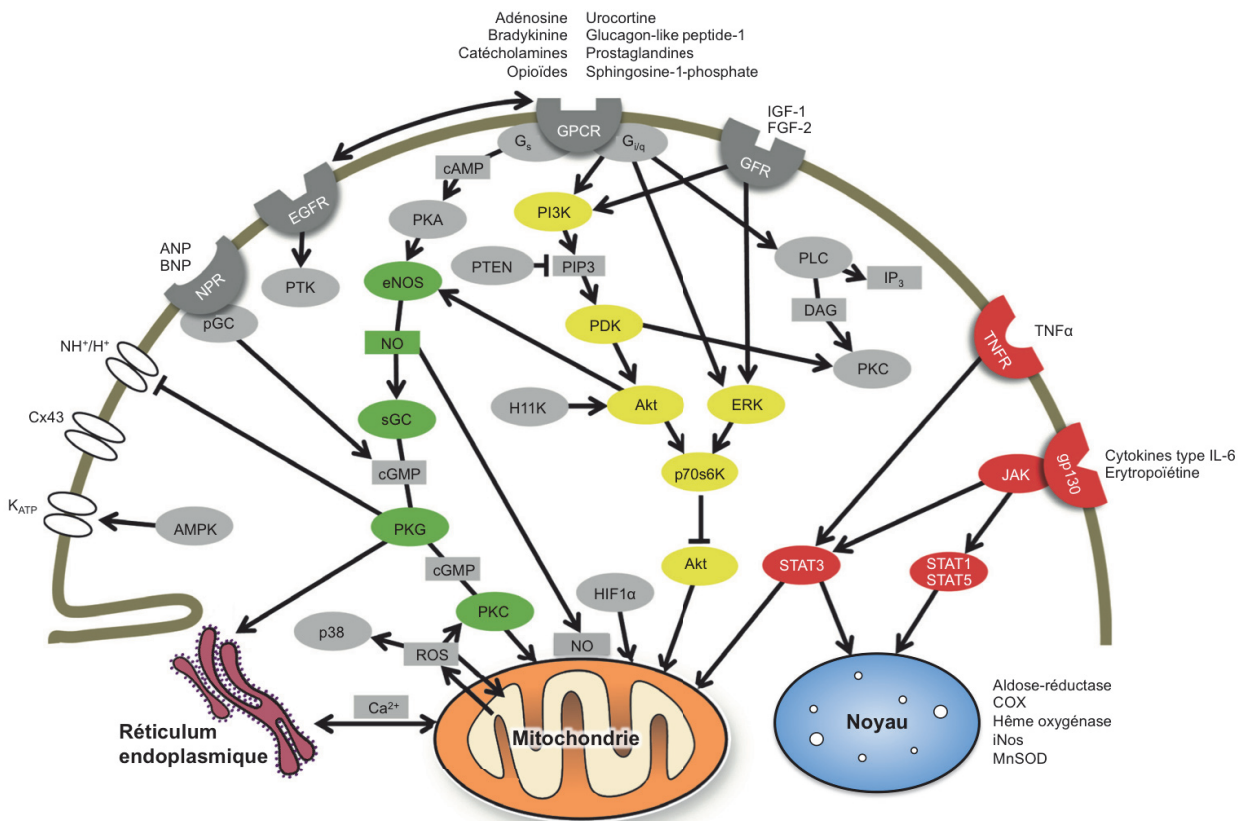


Figure 10 - Principaux signaux impliqués dans le conditionnement ischémique (d'après ¹⁸²).

Les inducteurs se fixent à leurs récepteurs entraînant la transduction du signal intracellulaire impliquant notamment la voie RISK (jaune), SAFE (en rouge) et NO/PKG (en vert). La mitochondrie est la principale cible finale des voies de protection.

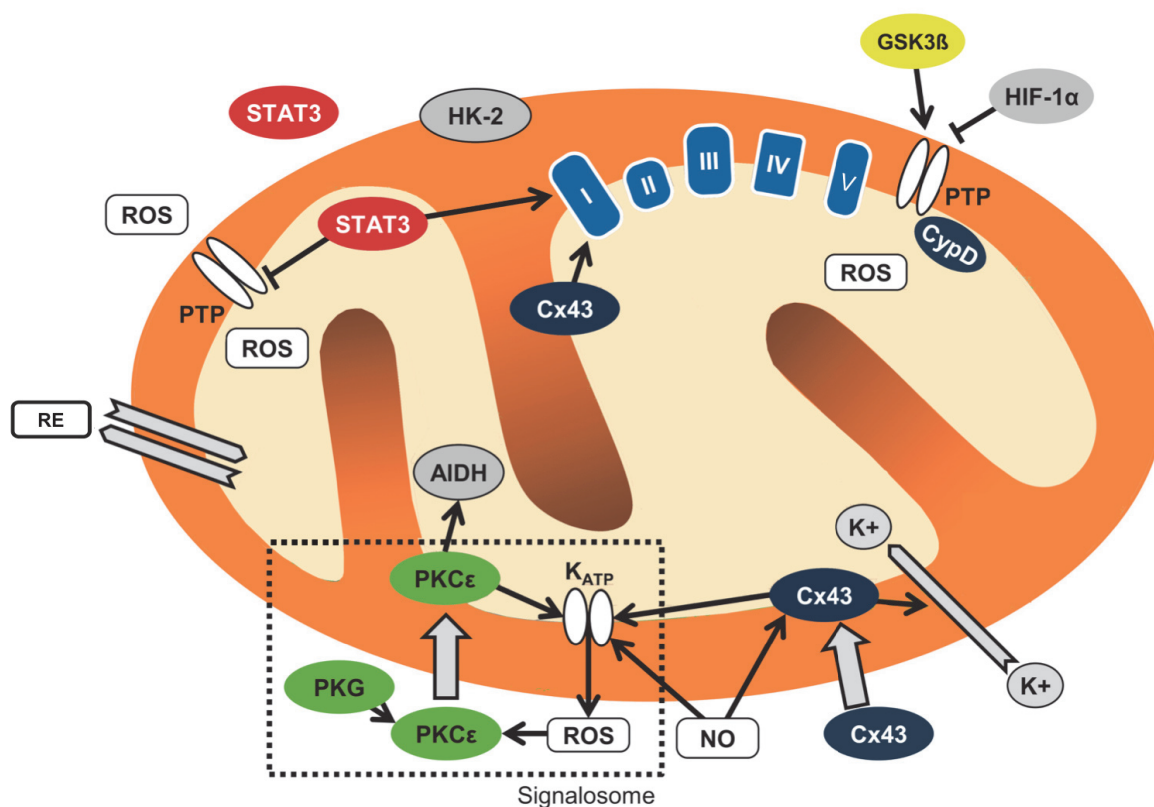


Figure 11 - Mécanismes protecteurs mitochondriaux du conditionnement ischémique (d'après ¹⁸²).

Le PTP ainsi que les canaux K_{ATP} sont les principaux effecteurs finaux des voies de protections au sein de la mitochondrie

5.4 - Mécanismes du conditionnement ischémique à distance

Les mécanismes exacts du conditionnement ischémique à distance ne sont que partiellement compris. Des études expérimentales suggèrent que bon nombre des mécanismes sous-jacents et des cascades de transduction du signal activées dans l'organe protégé pourraient être similaires à ceux mis en jeu dans le cadre du PCI et du PostCI. Cependant, la voie qui transmet le signal cardioprotecteur de l'organe ou du tissu preconditionné à distance de l'organe protégé reste incertaine. L'implication d'une voie hormonale est probable car la reperfusion au niveau de l'organe cible est nécessaire pour obtenir des effets cardio-protecteurs du CI à distance.¹⁸⁴ En effet, le sang prélevé sur un lapin préalablement soumis au PCI du cœur et des reins réduisait la taille de l'infarctus lorsqu'il était transfusé à un lapin contrôle.²⁷⁸ Le système nerveux végétatif semble également impliqué puisque les interventions visant à arrêter son

fonctionnement au niveau de l'organe cible limitent également les effets protecteurs du CI à distance.²⁷⁹⁻²⁸¹ Ainsi, dans le cadre de la cardioprotection, le transfert du signal de l'organe périphérique (cerveau, mésentère, rein, muscle squelettique, peau) au cœur semble le résultat d'une interaction neurohumorale complexe. L'I/R et certaines molécules (adénosine, bradykinine, caspaïcine) activent des fibres sensorielles dans l'organe périphérique qui activent l'innervation cardiaque végétative par le système nerveux central et libèrent un facteur humoral non identifié. Ce facteur hormonal semble avoir un poids moléculaire <15 kDa et être hydrophobe. L'adénosine, la bradykinine, les opioïdes, l'IL-10 semblent des triggers locaux. PKC, la voie RISK, la NOS endothéliale, HIF1 α et STAT 5 semblent être des médiateurs. Enfin, les canaux mitoK_{ATP} et le PTP semblent être des effecteurs.^{174,182,189,282}

6 - Conditionnement pharmacologique par la ciclosporine A

6.1 - Historique

Deux chercheurs suisses, Jean F. Borel et Hartmann F. Stähelin, sont à l'origine de la découverte de la ciclosporine. Depuis 1958, le laboratoire Sandoz (devenu depuis Novartis) avait mis en place un programme de recherche de nouveaux agents antifongiques. Des prélèvements de sols dans différents endroits du monde ramenés par les employés étaient utilisés pour fournir une source de micro-organismes testés pour leur activité antifongique. En 1970, un prélèvement issu de Hardangervidda en Norvège contenait notamment la levure *Tolypocladium inflatum* Gams capable de synthétiser de nouveaux peptides cycliques. La substance produite par cette levure, initialement appelée 24-556, a ensuite été testée au sein du laboratoire Sandoz de Vienne et a démontré sa capacité à inhiber très sélectivement la prolifération des lymphocytes. Deux composants cycliques du 24-556 ont alors été identifiés et dénommés ciclosporine A et B. Plus tard, près de 30 variantes de ciclosporines extraites naturellement ont ensuite été identifiées. Toutes ces substances ont une structure chimique de 11 acides aminés et diffèrent pour la plupart par un seul locus d'acides aminés. Parmi les composés testés, la version la plus ancienne, la CsA, s'est avérée la plus puissante. Les premières publications sur le profil biologique de la ciclosporine ont été publiées en 1976.²⁸³ Les recherches précliniques et cliniques étaient compliquées par la faible solubilité de la ciclosporine dans l'eau et les difficultés

galéniques qui en résultaient. Il n'a finalement fallu que quatre ans entre la découverte des effets immunologiques et le feu vert pour les essais cliniques. Les résultats spectaculaires obtenus avec la CsA dans des expériences de transplantation chez l'animal ont ensuite permis d'utiliser la molécule pour des greffes rénales chez l'Homme. La CsA a finalement été commercialisée en 1983.

6.2 - Pharmacologie

La CsA est un peptide cyclique lipophile d'un poids moléculaire de 1202 kDa dont la formule est $C_{62}H_{111}O_{12}$. Les propriétés pharmacocinétiques de la CsA montrent une grande variabilité interindividuelle avec une biodisponibilité après absorption orale de 5 à 70% chez les volontaires sains. Du fait de sa grande lipophilie, les concentrations dans les tissus sont corrélées avec la quantité de lipides qu'ils contiennent. Elle ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et ne pénètre pas de manière significative dans le liquide céphalo-rachidien. La CsA est métabolisée par les enzymes du cytochrome P450-3A principalement dans le foie avec une élimination principalement biliaire (90%). Elle agit de manière spécifique et réversible sur les lymphocytes (en particulier les cellules T auxiliaires) produisant une suppression sélective de l'immunité à médiation cellulaire. La CsA forme un complexe avec la cyclophiline A (CypA) dans le cytoplasme qui se lie ensuite à la calcineurine, une phosphatase dépendante du calcium et de la calmoduline. L'inhibition de l'activité de la calcineurine bloque la translocation du *Nuclear Factor of Activated T-cells* (NFATc), un facteur nucléaire permettant la transcription du gène de l'IL-2. La CsA inhibe donc la transcription du gène de l'IL-2 mais aussi de plusieurs autres cytokines nécessaires à la réponse immunitaire produisant des effets indirects sur d'autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire.

Rappelons que les cyclophilines sont une famille de protéines qui ont une activité peptidyl-prolyl-isomérase. On distingue au moins 16 formes structurellement distinctes chez l'Homme. Parmi elles, la forme la plus abondante est la CypA. La CypD, localisée dans la mitochondrie, est la cible des effets protecteurs de la CsA dans l'I/R.

6.3 - Application dans l'ischémie-reperfusion

- Myocarde :

Les tout premiers travaux sur les effets mitochondriaux de la CsA datent de la fin des années 80 avec la découverte de l'inhibition de la respiration mitochondriale et de l'efflux de calcium par la CsA.^{89,284} En 1988, Crompton *et al.* montraient sur des mitochondries cardiaques que l'ouverture d'un pore mitochondrial calcium dépendant pouvait être inhibée par la CsA.²⁸⁵ L'implication de la CypD dans l'inhibition du PTP par la CsA a été montrée en 1990 par Halestrap et Davidson et définitivement confirmée ensuite sur des modèles d'animaux CypD-KO.^{105-107,286} En 1991, l'équipe de Crompton démontrait des effets bénéfiques de la CsA sur des cardiomyocytes en culture soumis à une hypoxie-réoxygénation.²⁸⁷ La capacité de la CsA à protéger le myocarde contre les effets délétères de l'I/R a été rapportée en 1993 par Griffiths et Halestrap : sur un modèle de cœur de rat isolé et perfusé en Langendorff, le prétraitement par la CsA améliorait la récupération fonctionnelle et préservait le contenu en ATP myocardique après un épisode d'I/R.²⁸⁸ L'effet protecteur de la CsA était bien en rapport avec ses effets mitochondriaux et non à l'inhibition de la calcineurine car le tacrolimus (FK-506, un inhibiteur de la calcineurine) n'avait pas d'effet protecteur. En utilisant un dérivé non-immunosuppresseur de la CsA se fixant spécifiquement sur la CypD (N-méthyl-4-valine-ciclosporine, NIM811) d'autres auteurs ont confirmé ce mécanisme.²⁸⁹ Sur des modèles de cœurs isolés et perfusés, il a ensuite été démontré que la CsA réduisait la taille de l'infarctus.²⁹⁰⁻²⁹²

Faisant suite aux premières études portant sur l'administration de la CsA avant ou pendant l'épisode ischémique, l'équipe de Hausenloy démontrait, en 2002, que l'administration de CsA au début de la reperfusion myocardique limitait la taille de l'IDM.²⁵⁴ Depuis de nombreuses études expérimentales, y compris *in vivo*, ont démontré l'efficacité de l'administration de la CsA au moment de la reperfusion myocardique (tableau 4).

La translation chez l'homme a d'abord débuté en 2003 par l'étude de tranches de tissu humain d'auricule droit prélevés lors de chirurgie cardiaque et soumis à des épisodes ischémiques,²⁹³ suivie par des études cliniques confirmant les effets protecteurs de la CsA (tableau 4). En 2008, *Piot et al.* ont été les premiers à démontrer, dans une petite étude clinique « preuve de concept », qu'un seul bolus intraveineux de CsA (2,5 mg/kg) dix minutes avant la désocclusion coronaire permettait de réduire de 40% la taille de

l'IDM (estimée par la créatinine kinase sérique totale et l'IRM).²⁵⁹ L'essai CYCLE (*CYCLOsporinE A in Reperfused Acute Myocardial Infarction*) a testé la CsA dans une étude de phase II randomisée de plus grande envergure regroupant 410 patients présentant un IDM. Les sujets ont été randomisés dans un groupe recevant un bolus de CsA intraveineux 2,5 mg/kg au moins 5 minutes avant une coronarographie et dans un groupe contrôle. Le traitement par CsA n'avait pas d'effet sur le critère de jugement principal qui était la correction du sus-décalage du segment ST à l'ECG ni sur les critères secondaires qui étaient le taux de troponine à J4, le remodelage ventriculaire gauche et la morbi-mortalité à 6 mois.²⁹⁴ L'essai CIRCUS (*Cyclosporine to Improve Clinical Outcome in ST-elevation myocardial infarction patients*) était un essai clinique de phase III multicentrique, en double aveugle, randomisé, comparant le CsA à un placebo chez 970 patients présentant un IDM avec une occlusion documentée par coronarographie.²⁶⁰ La CsA ou une perfusion du placebo correspondant ont été administrées 2 à 3 minutes avant la coronarographie. Le temps ischémique moyen était d'environ 4,5 heures dans les deux bras. Là encore, aucune différence n'était observée que ce soit sur le critère de jugement principal composite (mortalité toutes causes confondues, aggravation de l'insuffisance cardiaque lors de l'hospitalisation initiale, réhospitalisation pour insuffisance cardiaque ou remodelage ventriculaire gauche un an après l'événement) ou les critères de jugement secondaires (modification d'un des composants du critère de jugement primaire, modification de la fraction d'éjection ventriculaire gauche à un an, IDM récidivant, AVC ou angor instable). De plus, la CsA ne réduisait pas l'élévation du segment ST ou la taille de l'infarctus selon des critères biochimiques. Un certain nombre de points différaient des études préalables telles que les posologies de CsA (de 2,5 à 10 mg/kg), les timing d'injection, les comorbidités des patients (non pris en compte en recherche expérimentale) ou encore les prises en charge coronarographiques. Plus largement, ces résultats divergents entre les espoirs formulés par les études expérimentales et la négativité des études cliniques prospectives et randomisées illustrent les difficultés de la recherche translationnelle.²⁹⁵

Tableau 4 - Principales études cliniques sur la cardioprotection par la CsA

Réf., auteur, date	N =	Inclusions	Dose	Timing	↓ IDM
²⁵⁹ Piot, 2008	N = 58	STEMI	2,5 mg/kg	<10min avant reperfusion	40% ASC CK 20% IRM
²⁹⁶ Mewton, 2010	N = 28	STEMI	2,5 mg/kg	Avant coronarographie	20% IRM
²⁹⁷ Ghaffari, 2013	N = 101	STEMI	2,5 mg/kg	Immédiatement avant reperfusion	NS
²⁹⁸ Chiari, 2014	N = 61	CVA	2,5 mg/kg	<10min avant déclantage	35% ASC troponine
²⁹⁹ Hausenloy, 2014	N = 78	PAC	2,5 mg/kg	Avant clampage aortique	38% ASC troponine
²⁶⁰ CIRCUS, 2015	N = 791	STEMI	2,5 mg/kg	Avant coronarographie	NS
²⁹⁴ CYCLE, 2016	N = 410	STEMI	2,5 mg/kg	<5 min avant reperfusion	NS

Réf. : référence bibliographique ; STEMI : *ST-Elevation Myocardial Infarction* ; ASC : air sous la courbe ; CK : créatine kinase ; NS : non significatif ; CVA : chirurgie valvulaire aortique ; PAC : pontage aorto-coronarien.

- Cerveau :

Un facteur limitant majeur de l'utilisation de la CsA à visée neuroprotectrice est sa faible capacité à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) malgré son caractère très liposoluble. En effet, la CsA est à la fois un substrat et un inhibiteur de la glycoprotéine P, un transporteur membranaire codé par le gène MDR-1 (*Multi-Drug Resistance-1*).³⁰⁰ Cette protéine est une pompe transportant ses substrats du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Ce mécanisme moléculaire contribue d'ailleurs à la résistance des tumeurs à de nombreux agents de chimiothérapie. L'augmentation des doses de CsA par des bolus intraveineux pourrait permettre de saturer les capacités d'élimination de ces pompes effluentes et de favoriser ainsi le passage intracérébral. Par ailleurs, il a été démontré que les effets protecteurs de la CsA peuvent être renforcés par une rupture mécanique de la BHE,^{301,302} ce qui s'observe notamment lors d'un traumatisme crânien, d'un accident vasculaire cérébral (AVC) ou d'un AC.

L'une des premières études menées pour tester les possibles effets neuroprotecteurs de la CsA date de 1990.³⁰³ Les auteurs montraient alors, dans un modèle d'hémorragie méningée, que la CsA prévenait de manière efficace le vasospasme. Les effets anti-ischémiques ont ensuite été étudiés dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne dans lequel les animaux étaient traités avec une dose orale de CsA pendant une semaine avant l'ischémie.³⁰⁴ L'effet neuroprotecteur de la CsA a ensuite été confirmé en 1998 par Uchino *et al.* qui ont démontré, dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, une réduction de la taille de l'infarctus cérébral après injection intra-péritonéale de 10 mg/kg de CsA. Les auteurs ont utilisé une aiguille pour perméabiliser la BHE. Ils évoquaient alors l'implication du PTP dans les mécanismes protecteurs observés.³⁰⁵ En 1999, Matsumoto *et al.* ont montré, dans un modèle d'occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne, que la CsA réduisait le volume des lésions corticales et que cet effet neuroprotecteur pouvait être reproduit avec un dérivé non-immunosuppresseur de la CsA (NIM811).³⁰⁶

L'implication directe du PTP a pu être ensuite précisée dans un modèle d'ischémie cérébrale transitoire chez des souris déficientes en CypD : le volume des lésions était diminué de 62% chez ces souris CypD-KO par rapport aux souris contrôles.³⁰⁷

L'une des premières études en clinique humaine, réalisée par Empey *et al.*, a exploré la pharmacocinétique de la CsA dans les traumatismes crâniens.³⁰⁸ En 2015, un essai contrôlé multicentrique français, en simple aveugle, a inclus 127 patients ayant eu un traitement thrombolytique après un AVC recevant une injection en bolus de 2 mg/kg de CsA ou un placebo.³⁰⁹ Aucune différence significative sur le volume d'infarctus à 30 jours (constaté à l'IRM) n'a été observée entre les deux groupes. Les auteurs retrouvaient un plus petit volume d'infarctus dans le sous-groupe de patients avec une occlusion proximale.

- Rein :

De nombreux essais cliniques et expérimentaux ont montré que l'administration de CsA était susceptible d'entraîner une diminution de la fonction rénale. Les mécanismes de ce phénomène pourraient être un déséquilibre entre les concentrations de thromboxane A₂ et de prostaglandine E₂,^{310,311} une libération d'endothéline-1,^{310,312,313} et la réduction d'autres facteurs vasodilatateurs tels la prostacycline et le NO.^{314,315} Ces phénomènes expliquent probablement le nombre limité d'études sur la protection de la CsA dans l'I/R rénale.

Yang *et al.* ont montré que l'administration de la CsA (3mg/kg) injectée 6 heures avant l'ischémie permettait de limiter la hausse de la créatinine et les lésions histologiques tubulaires.³¹⁶ Dans un modèle d'ischémie rénale chez le rat, Singh *et al.* ont retrouvé un effet néphroprotecteur de la CsA.³¹⁷ En 2015, Lemoine *et al.* ont injecté 3mg/kg de CsA après ligature de l'artère rénale chez des souris (préalablement néphrectomisées du rein controlatéral). Les taux de créatinine 24 heures après la reperfusion étaient diminués dans le groupe CsA, les lésions histologiques étaient également significativement diminuées. Les auteurs observaient également une préservation des fonctions mitochondriales (évaluées par la capacité de rétention calcique et la phosphorylation oxydative).³¹⁸ La même équipe, sur le même modèle expérimental, montrait que les effets protecteurs de la CsA dépendaient de sa dose et de son délai d'injection avant l'épisode ischémique.³¹⁹

- Foie :

Les études expérimentales sur les effets protecteurs de la CsA sur les lésions d'I/R hépatiques sont peu nombreuses. Les premières expérimentations datent de 1988 sur un modèle d'ischémie hépatique chez le chien.³²⁰ En 1989, Kawano *et al.* testaient l'injection de 10 mg/kg de CsA durant quatre jours avant une ischémie hépatique induite chez des rats et retrouvaient une amélioration de la survie et une diminution de la nécrose hépatique dans le groupe CsA.³²¹ La même année, Broekemeier *et al.* mettaient en évidence, sur des mitochondries isolées à partir d'hépatocytes de rats, l'implication du PTP dans les effets protecteurs de la CsA.³²² En 1993, Suzuki *et al.* montraient que l'injection de CsA avant une ischémie hépatique chez le rat permettait de diminuer l'infiltration des polynucléaires neutrophiles et améliorait la survie,³²³ et Pastorino *et al.* rapportaient que la CsA limitait la mort des hépatocytes soumis à une hypoxie, effet attribué à l'inhibition du PTP.³²⁴ Quelques années plus tard, sur un modèle d'ischémie hépatique chez le cochon, les auteurs retrouvaient une baisse de la cytolysse hépatique dans le groupe ayant bénéficié au préalable de la prise orale de CsA durant quatre jours.³²⁵ En 2007, Zhong *et al.* montraient que la NIM811 ajoutée à un transplant hépatique permettait, chez le rat, de limiter les lésions hépatiques.³²⁶ Des résultats similaires étaient retrouvés après administration orale de NIM811 chez des souris soumises à une transplantation hépatique.³²⁷

- Choc septique :

Faisant le constat que la mitochondrie et les voies d'induction de l'apoptose jouaient également un rôle central dans la physiopathologie du sepsis, l'équipe de Nevière, a montré, sur un modèle de choc induit par injection d'endotoxine chez le rat, que la CsA prévenait la dysfonction myocardique septique en inhibant l'apoptose.³²⁸ Dans un modèle de sepsis sur péritonite, la même équipe montrait que l'injection sous-cutanée de CsA permettait de prévenir la dysfonction myocardique et pulmonaire secondaire au sepsis.³²⁹ Par ailleurs, la CsA pourrait améliorer l'état de choc en inhibant la production de NO.³³⁰

- Arrêt cardiaque :

Notre équipe a montré en 2011, sur un modèle d'AC chez le lapin, les effets protecteurs de l'injection de la CsA.³³¹ Il s'agissait d'un modèle d'AC asphyxique (15 minutes d'AC) comportant un groupe contrôle, un groupe avec injection de 5 mg/kg de CsA et un groupe avec injection de 2,5 mg/kg de NIM81. Les injections avaient lieu au début de la RCP. La CsA et la NIM811 ont permis, dans ce modèle, d'améliorer la survie à court terme, de limiter la dysfonction cardiaque (évaluée par sonomicrométrie et dosage de la troponine) et la défaillance multiviscérale (évaluée par dosage sanguin de biomarqueurs). Ces résultats étaient liés à une meilleure phosphorylation oxydative et une inhibition de l'ouverture du PTP dans les mitochondries isolées du myocarde et du cerveau des groupes CsA et NIM811. La même année, Huang *et al.* ont étudié les effets protecteurs de l'injection de la CsA (10 mg/kg) au moment de la RCP sur un modèle d'AC asphyxique (8,5 minutes d'AC) chez le rat. Les auteurs retrouvaient également une meilleure fonction cardiaque et une amélioration de la survie à 72 heures dans le groupe CsA en lien avec les effets mitochondriaux de la CsA.³³² En revanche, l'injection de CsA décalée de 3 minutes après la RACS n'avait plus d'effet protecteur. En 2016, une équipe confirmait les effets protecteurs mitochondriaux de la CsA sur un modèle d'AC asphyxique chez le rat.³³³ Comme nous l'avons vu précédemment, notre équipe a testé, dans une étude prospective, multicentrique et randomisée, l'injection pré-hospitalière de CsA chez des patients ayant présenté un AC extra-hospitalier par rythme non choquable. Les patients étaient randomisés pour recevoir au début de la réanimation cardiaque extrahospitalière une dose intraveineuse unique de 2,5 mg/kg de CsA (groupe ciclosporine) ou ne recevoir aucun traitement supplémentaire (groupe témoin). L'injection de CsA était réalisée en pré-

hospitalier par les équipes médicalisées du SAMU. Après analyse des 67 patients vivants à 24 heures du groupe CsA et des 62 patients vivants à 24 heures du groupe contrôle, aucune différence significative sur l'amélioration des défaillances d'organes (score SOFA) n'était observée.⁶⁵ L'une des hypothèses formulée pour expliquer ce résultat est probablement le délai entre l'AC et l'injection de CsA. En effet, la rapidité d'intervention des secours a permis un délai entre leur arrivée et l'injection de CsA de seulement 8 minutes. Néanmoins, la RCP et donc la reperfusion avait commencé bien avant l'arrivée des secours médicalisés et donc le délai entre la reperfusion et l'injection de CsA était encore plus important. Ce délai n'existait pas dans les études expérimentales (tableau 5). Ces résultats ne remettent sans doute pas en cause les données des études expérimentales mais illustrent de nouveau les difficultés de la recherche translationnelle. De nouveaux essais devront être menés pour étudier les effets de la CsA sur d'autre type d'AC et l'association de la CsA à d'autres traitements des lésions de reperfusion.

Tableau 5 - Principales études sur la protection par la CsA dans l'AC

Réf., auteur, date	Espèce	AC	Durée	Dose	Timing	Protection
³³¹ Cour, 2011	Lapin	Non choquable	15 min	2,5 mg/kg	RCP	+
³³² Huang, 2011	Rat	Non choquable	8,5 min	10 mg/kg	RCP 3 min après RACS	+ -
⁶⁵ Argaud, 2015	Homme	Non choquable	≈ 10 min	2,5 mg/kg	>10min après RCP	-
³³³ Liu, 2016	Rat	Non choquable	10 min	10 mg/kg	RACS	+

Réf. : référence bibliographique ; AC : arrêt cardiaque ; RCP : réanimation cardio-pulmonaire ; RACS : reprise d'activité circulatoire spontanée.

B - Hypothermie thérapeutique

1 - Historique

Refroidir le corps humain à des fins thérapeutiques n'est pas une idée nouvelle.³³⁴ Le papyrus Edwin Smith, daté de 3500 av. J.-C., faisait état de nombreuses références à l'utilisation du froid comme thérapie. L'école de médecine hippocratique a utilisé le refroidissement corporel total pour le traitement du tétanos au cours des quatrième et cinquième siècles après J.-C. En 1791, le médecin français Philippe Pinel a fait état d'un patient guéri d'une pathologie maniaque sans autres effets indésirables apparents après avoir erré nu dans la forêt en hiver. Cet événement a précédé de près d'un siècle et demi l'utilisation de l'hypothermie pour les maladies mentales par John Talbot. Le baron Larrey, chirurgien de Napoléon auprès de la Grande Armée, a décrit l'utilisation de la glace et de la neige lors d'amputations sur des soldats. En utilisant des bains d'eau froide, William Osler aurait permis de diminuer fortement la mortalité due à la typhoïde. Le concept a ensuite connu une réapparition périodique dans la littérature médicale comme en 1937 lorsque le Dr. Temple Fay refroidissait un patient à 32 ° C pendant 24 h pour empêcher les cellules cancéreuses de se multiplier.³³⁵ En 1950, Bigelow *et al.*, faisaient état de l'effet bénéfique de l'hypothermie thérapeutique sur le cerveau et le cœur de chiens pendant la chirurgie cardiaque.³³⁶ La température était alors abaissée à 20°C. En 1954 Rosomoff *et al.* constataient une diminution linéaire de la consommation d'oxygène cérébral chez les chiens lorsque la température était abaissée de 35°C à 26°C.³³⁷ Deux ans plus tard, des modèles animaux montraient les effets bénéfiques de l'hypothermie après occlusion totale de la perfusion cérébrale.^{338,339} À cette époque, on présumait que l'hypothermie exerçait ses effets exclusivement par une réduction du métabolisme, entraînant une diminution de la demande en oxygène et en glucose dans le cerveau. L'hypothermie thérapeutique appliquée était alors profonde (<30°C). La première étude chez l'Homme portant sur l'hypothermie thérapeutique après un AC a été réalisée en 1958 et suggérait une diminution de la mortalité.³⁴⁰ Cette étude comprenait 19 patients réanimés après un AC périopératoire. L'hypothermie était induite en utilisant une couverture contenant un agent de refroidissement circulant. La température corporelle était maintenue à environ 31-32°C. La durée du

refroidissement était basée sur le jugement clinique. Sur les 7 patients n'ayant pas reçu d'hypothermie, un seul a survécu et sur les 12 patients refroidis, 6 ont survécu. Entre 1960 et les années 90, l'hypothermie thérapeutique est peu étudiée en raison des complications observées qui était en lien avec la profondeur de l'hypothermie alors appliquée. Des études expérimentales des années 90 suggèrent ensuite qu'une hypothermie thérapeutique modérée peut améliorer le pronostic neurologique.^{341,342} Il faut attendre 1997 pour voir publier une nouvelle étude clinique chez l'Homme. Ainsi, Bernard *et al.* ont conduit une étude prospective sur 22 patients victimes d'AC qui ont bénéficié d'une hypothermie thérapeutique à 33°C pendant 12 heures comparés alors à des patients contrôles « historiques ».³⁴³ Les auteurs retrouvaient une amélioration du pronostic neurologique et de la mortalité dans le groupe de patients hypothermes.

2 - Mécanismes d'action

2.1 - Cardioprotection

- Effets métaboliques :

L'hypothermie entraîne un ralentissement du rythme cardiaque qui a laissé supposer que cette bradycardie pouvait être un des mécanismes protecteurs. Ce ralentissement est lié à une prolongation du potentiel d'action et une baisse de la repolarisation spontanée des cardiomyocytes.³⁴⁴ Néanmoins, les études expérimentales ont démontré, sur des cœurs de lapins dont la fréquence cardiaque était maintenu par *pacing*, que les effets protecteurs de l'hypothermie, notamment sur la taille de l'infarctus, persistaient.^{345,346} Il est désormais admis, à partir de nombreuses études sur la cardioplégie froide utilisée en chirurgie cardiaque, que l'hypothermie protège le myocarde par une diminution du métabolisme.³⁴⁷⁻³⁵⁷ Ainsi, la réduction de la température cardiaque de 20°C réduit le métabolisme d'un facteur 4. L'hypothermie modérée (>30°C) diminue également le métabolisme.³⁵⁶⁻³⁵⁸ Parallèlement, l'augmentation des taux de catécholamines au cours d'une hypothermie thérapeutique modérée améliore la perfusion myocardique.³⁵⁹ Par ailleurs, l'hypothermie profonde (<32°C) limite la surcharge calcique et sodique en inhibant les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et Na^+/K^+ , en activant l'échangeur Na^+/H^+ ,³⁶⁰ et en limitant la formation de ROS à la reperfusion.^{361,362}

- Activation des voies de signalisation cellulaire :

L'hypothermie semble activer la phosphorylation d'Akt probablement sous l'action des protéines de choc thermique (HSP27, HSP70).^{357,363} Lorsque l'hypothermie est appliquée pendant la phase ischémique, Akt et la voie de signalisation MAPK/ERK sont activées.^{364,365} Sur un modèle de cœur isolé-perfusé, une équipe a montré que l'utilisation de wortmannine, un inhibiteur de la kinase IP3, était capable d'abolir les effets protecteurs de l'hypothermie.³⁶⁶ Ning *et al.* ont également montré le rôle cardioprotecteur de HIF-1 α , lorsqu'une hypothermie modérée était appliquée pendant l'ischémie.³⁶⁵ L'induction d'une hypothermie à la reperfusion semble également activer Akt.³⁶³ Une fois HSP27 et Akt activés, la NOS augmente la production de NO. Les quantités élevées de NO augmentent la nitrosylation des protéines dans les mitochondries, ce qui module ultérieurement la génération de ROS.^{363,366}

- Mécanismes mitochondriaux :

En appliquant une hypothermie profonde (17°C) sur un modèle d'ischémie myocardique *ex vivo*, Riess *et al.* ont mis en évidence une diminution de la production de ROS et de la surcharge calcique et une préservation des taux de NADH.³⁶¹ *In vivo*, l'équipe de Renaud Tissier a étudié les effets mitochondriaux de l'hypothermie sur un modèle d'ischémie cardiaque chez le lapin. Une hypothermie modérée per-ischémique a permis de prévenir l'altération de la phosphorylation oxydative mitochondriale ainsi que la susceptibilité d'ouverture du PTP mesurée par capacité de rétention calcique (CRC).³⁶⁷ Le mécanisme exact par lequel l'hypothermie inhibe le PTP reste inconnu, mais de nombreuses hypothèses sont plausibles : la préservation des stocks d'ATP, la baisse de la production de ROS ou encore l'activation des voies de protection cellulaire. La même équipe a mis en évidence les effets de l'hypothermie dans un contexte ischémique sur des mitochondries cardiaques avec une amélioration de la phosphorylation oxydative et du fonctionnement des complexes I, II et III.³⁶⁸

2.2 - Neuroprotection**- Effets métaboliques :**

Une baisse de 1°C entraîne une baisse de la consommation d'oxygène et du métabolisme glucidique cérébral d'environ 5%. L'hypothermie accélère la restauration des stocks d'ATP à la reperfusion ce qui permet de limiter la production d'acide lactique

qui dépend du métabolisme anaérobie et de maintenir ainsi le pH tissulaire.^{369,370} Par exemple, une hypothermie modérée (34°C) augmente le taux de récupération métabolique de 10 à 20 % pendant les 10 à 25 premières minutes de reperfusion après 15 minutes d'ischémie globale transitoire.³⁷¹ L'effet du refroidissement sur le flux sanguin cérébral est plus complexe. En effet, en condition physiologique, l'hypothermie diminue le débit sanguin cérébral. En revanche, ses effets sont différents dans l'I/R : lorsque la circulation sanguine est rétablie après un épisode ischémique, on observe une hyperhémie suivie d'une baisse graduelle sur quelques heures. L'hypothermie atténue l'hyperhémie et prévient la réduction graduelle du débit sanguin cérébral qui suit.³⁷² Cependant, les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique ne peuvent se résumer à ses seuls effets sur les stocks d'ATP puisqu'une hypothermie même appliquée à distance de ces processus physiopathologiques conserve ses effets protecteurs.³⁷³

- Baisse de la libération de glutamate :

L'hypothermie prévient également l'accumulation ou la libération d'acides aminés excitotoxiques tels que le glutamate. Cet effet est sans doute la conséquence de la préservation des stocks d'ATP nécessaires pour maintenir les gradients ioniques permettant ainsi de limiter la surcharge calcique et la libération de glutamate à la reperfusion.³⁷⁴ Par ailleurs, l'hypothermie limite la baisse d'expression, induite par l'ischémie, d'une sous-unité (GluR2) du récepteur au glutamate (AMPA) ce qui limite l'afflux de calcium à la reperfusion.³⁷⁵ En réduisant l'afflux de glutamate, la mobilisation du calcium et la consommation en ATP, l'hypothermie atténue l'œdème cytotoxique.³⁷⁶

- Activation des voies de signalisation cellulaire :

Bien que l'hypothermie diminue la synthèse protéique en condition physiologique, elle peut aussi la réguler à la hausse ou la maintenir dans des conditions d'I/R pour les protéines impliquées dans la survie cellulaire. Ainsi, l'hypothermie augmente la phosphorylation de ERK dans un modèle d'AC chez le rat.³⁷⁷ Néanmoins, des auteurs ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur de ERK (U0126) n'abolissait pas les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique.³⁷⁸ Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, Zhao *et al.* ont démontré que l'hypothermie thérapeutique (appliquée en pré-conditionnement) permettait de maintenir la phosphorylation d'Akt et que l'administration d'un inhibiteur de la voie Akt/IP3 entraînait une aggravation de

l'infarctus cérébral chez les animaux hypothermes.³⁷⁹ En revanche, l'hypothermie n'augmentait pas la phosphorylation de GSK3 β mais prévenait la translocation au noyau de la β -catéine, un des substrats de GSK3 β impliqué dans l'apoptose.³⁷⁹

L'hypothermie agit également sur les voies de l'apoptose intrinsèque et extrinsèque. Elle augmente la production endogène de la protéine anti-apoptotique BCL-2,³⁸⁰ diminue la libération de cytochrome c,³⁸¹ baisse l'activité des caspases,^{382,383} et inhibe l'expression de BAX.³⁸⁴ Dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le rat, l'hypothermie entraînait une diminution de l'expression de la protéine transmembranaire FAS,³⁸² de FASL et limitait l'activation de la caspase 8.³⁸⁵ Récemment, des auteurs ont montré que l'hypothermie réduisait également l'expression de la dynamine-1, une protéine capable de transporter FAS du RE à la surface cellulaire le rendant ainsi disponible pour FASL.³⁸⁶

- Effets anti-inflammatoires :

L'hypothermie diminue l'infiltration leucocytaire intra-cérébrale en empêchant leur liaison à l'endothélium vasculaire,³⁸⁷ et en régulant à la baisse la molécule d'adhésion ICAM-1.³⁸⁸ Les effets sur l'expression de ICAM-1 pourraient dépendre des effets de l'hypothermie sur la voie ERK.³⁸⁹ Par ailleurs, l'hypothermie diminue l'expression des cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β , TNF α , IL-6.³⁹⁰ De façon intéressante, ces effets anti-inflammatoires ont également été observés dans des modèles d'inflammation cérébrale sans mort cellulaire ce qui suggère que l'hypothermie a des effets directs sur les réponses immunitaires.^{391,392} Chez l'homme, il a été démontré que l'hypothermie supprime la production de cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes périphériques et la production d'IL-6 dans les suites d'un traumatisme cérébral.^{393,394} Enfin, plusieurs études ont démontré qu'elle diminuait la production de ROS,³⁹⁵⁻³⁹⁸ et limitait l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B) qui joue un rôle majeur dans la réponse inflammatoire.³⁹⁹

- Effets sur la barrière hémato-encéphalique et l'œdème cérébral :

De nombreux modèles d'ischémie cérébrale, de traumatisme et d'hémorragie intracérébrales ont montré que l'hypothermie protège l'intégrité de la BHE et prévient la formation d'œdème.^{369,400} Elle empêche l'activation des protéases responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire, comme les métalloprotéinases de la matrice,⁴⁰¹ et prévient ainsi la dégradation des protéines de la membrane basale

vasculaire et des protéines de la matrice extracellulaire. Dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat, la préservation de l'intégrité de la BHE a été mise en évidence 5 jours après l'arrêt de l'hypothermie, démontrant ses effets à long terme.⁴⁰² Dans un modèle d'AC, une équipe a également montré que les effets anti-œdémateux de l'hypothermie seraient liés à l'inhibition de l'expression de l'aquaporine 4, une protéine qui contrôle les mouvements d'eau au travers des membranes cellulaires.⁴⁰³

3 - Application clinique dans l'arrêt cardiaque

3.1 - Principales études cliniques

Nous faisons, dans le tableau 6, la synthèse des principales études cliniques sur l'hypothermie thérapeutique dans l'AC. Les recommandations sur son application après un AC réanimé ont été établies principalement à partir des données de trois études cliniques prospectives randomisées multicentriques.^{9,54,55}

La première étude, européenne, a été conduite entre 1996 et 2001 avec l'inclusion de 275 patients randomisés en deux groupes : normothermie et hypothermie. L'hypothermie, avec une cible entre 32 et 34°C, était maintenue 24 heures.⁵⁵ Il s'agissait d'AC de meilleurs pronostics (AC devant témoins, FV, AC présumés d'origine cardiaque). La cible thermique était atteinte en 8 heures (médiane). L'étude retrouvait une amélioration significative du pronostic neurologique à 6 mois dans le groupe hypothermie ainsi qu'une baisse du risque de décès à 6 mois. Enfin, l'étude ne retrouvait pas de différence significative en terme de survenue de complications.

La seconde étude, australienne, a été conduite entre 1996 et 1999 avec l'inclusion de 77 patients randomisés selon les mêmes groupes.⁵⁴ Il s'agissait également d'AC de meilleurs pronostics puisque seuls les AC en FV étaient recrutés et ils avaient lieu devant témoins pour la très large majorité (>90%). L'hypothermie était débutée dès la phase pré-hospitalière et maintenue pendant 12 heures avec une cible à 33°C. L'étude retrouvait une amélioration significative du pronostic neurologique avec un taux de survie sans séquelles majeures à la sortie de l'hôpital de 49% dans le groupe hypothermie contre 26% dans le groupe contrôle (p=0,046).

Ainsi, en 2005 puis en 2010, les recommandations internationales préconisent une hypothermie induite entre 32 et 34°C pendant 12 à 24 heures à débiter le plus tôt possible pour les AC en FV et à envisager pour les AC sans rythme choquable.⁴⁰⁴

Dans une nouvelle étude internationale récente de grande envergure conduite entre 2010 et 2013, 950 patients ont été randomisés en deux groupes : un groupe hypotherme à 33°C et un groupe hypotherme à 36°C.³⁹ Il s'agissait d'AC de cause présumée cardiaque mais présentant tous types de rythme initiaux. L'hypothermie était débutée à l'hôpital et maintenue pendant 36 heures. Ni la mortalité ni le pronostic neurologique à 6 mois n'étaient significativement différents entre les deux groupes.⁹ Cette étude a conduit à une modification des recommandations publiées en 2015. Il est désormais recommandé d'appliquer un contrôle thermique entre 32 et 36°C pendant au moins 24 heures chez les patients comateux après un AC avec rythme choquable. Ce contrôle thermique est toujours suggéré pour les rythmes non choquables. L'étude TTM-2 « *Targeted Hypothermia Versus Targeted Normothermia After Out-of-hospital Cardiac Arrest* » actuellement en cours et dont les résultats devraient être connus à partir de 2020 est attendue avec une certaine fébrilité. Les autres études ont un niveau de preuve beaucoup plus faible car menées sur de petits effectifs, rétrospectives,^{343,405-410} de faisabilité,⁴¹¹ ou observationnelle.⁴¹² Néanmoins, plusieurs de ces études semblent trouver un effet moindre de l'hypothermie thérapeutique chez les patients victimes d'AC de rythme non choquable.^{406,410,413-415}

Tableau 6 - Principales études cliniques sur l'hypothermie thérapeutique dans l'AC

Réf., auteur, date	Random.	Type d'AC	Hypothermie	HT/CTRL	Résultats
³⁴³ , Bernard, 1997	Non	ACEH, RC	33°C, 12h	22/22	Amélioration score de GOCS à la sortie de l'hôpital
⁴¹¹ , Hachimi-Idrissi, 2001	Oui	ACEH, RNC	34°C, réchauffement passif sur 8h	16/14	NS
⁵⁵ , HACA, 2002	Oui	ACEH, cause cardiaque, RC	33°C, 24h,	136/137	Amélioration neurologique et survie à 6 mois
⁵⁴ , Bernard, 2002	Oui	ACEH, cause cardiaque, RC	33°C, 12h,	43/34	Amélioration neurologique à la sortie de l'hôpital
⁴¹⁶ , Laurent, 2005	Oui	ACEH, cause cardiaque, FV ou asystole	32-33°C (CVVH), 24h	22/19	Amélioration survie à 6 mois sous CVVH
⁴¹³ , Oddo, 2006	Non	ACEH, RC/RNC	33°C, 24h	55/54	Amélioration CPC pour les RC
⁴⁰⁵ , Belliard, 2007	Non	ACEH, FV	32-34°C, 24-48h	32/36	Amélioration survie à J50
⁴⁰⁷ , Storm, 2008	Non	ACEH, RC/RNC	33°C, 24h	52/74	Amélioration CPC à la sortie hôpital et survie à 1 an
⁴¹² , Derwall, 2009	Non	ACEH, RC/RNC	33°C, 24h	37/31	NS (S100 β à J5)
⁴⁰⁸ , Ferreira, 2009	Non	ACEH, RC/RNC	33°C, 24h	49/26	Amélioration survie et CPC
⁴⁰⁶ , Don, 2009	Non	ACEH, RC/RNC	33,5-34,5°C, 12h	132/287	Amélioration survie pour les RC

⁴⁰⁹ , Testori, 2011	Non	ACEH, RNC	33°C, 24h	135/239	Amélioration neurologique et survie à 6 mois
⁴¹⁴ , Dumas, 2011	Non	ACEH, RC/RNC	<34°C, 48h	718/427	Amélioration CPC sortie hôpital pour les RC
⁴¹⁰ , Vaahersalo, 2013	Non	ACEH, RC/RNC	33°C, 24h	311/193	Amélioration CPC pour les RC
⁹ , Nielsen, 2013	Oui	ACEH, G<8, RC/RNC	33°C, 28h, réchauffement de 0,5°C/h	473/466	NS (survie 6mois)
⁴¹⁵ , Mader, 2014	Non	ACEH, RC/RNC		3452/2917	Aggravation neurologique sortie hôpital

Réf. : référence bibliographique ; Random. : randomisation ; AC : arrêt cardiaque ; HT : hypothermie thérapeutique ; CTRL : contrôles ; ACEH : arrêt cardiaque extrahospitalier ; RC : rythme choquable ; GOCS : *Glasgow Outcome Coma Scale* ; RNC : rythme non choquable ; FV : fibrillation ventriculaire ; NS : non significatif ; CPC : catégorie de performance cérébrale.

3.2 - Techniques

L'application pratique de la l'hypothermie thérapeutique se divise en trois phases : induction, maintien et réchauffement (figure 12). Les données expérimentales suggèrent que l'induction de l'hypothermie doit être la plus précoce possible et les différentes techniques développées ont toutes pour but d'atteindre la cible thermique le plus rapidement possible. Les données expérimentales suggèrent que le réchauffement doit être lent et progressif pour ne pas perdre les bénéfices de l'hypothermie.⁴¹⁷⁻⁴¹⁹ Aucune technique n'a démontré sa supériorité en terme d'amélioration de la morbi-mortalité après AC.

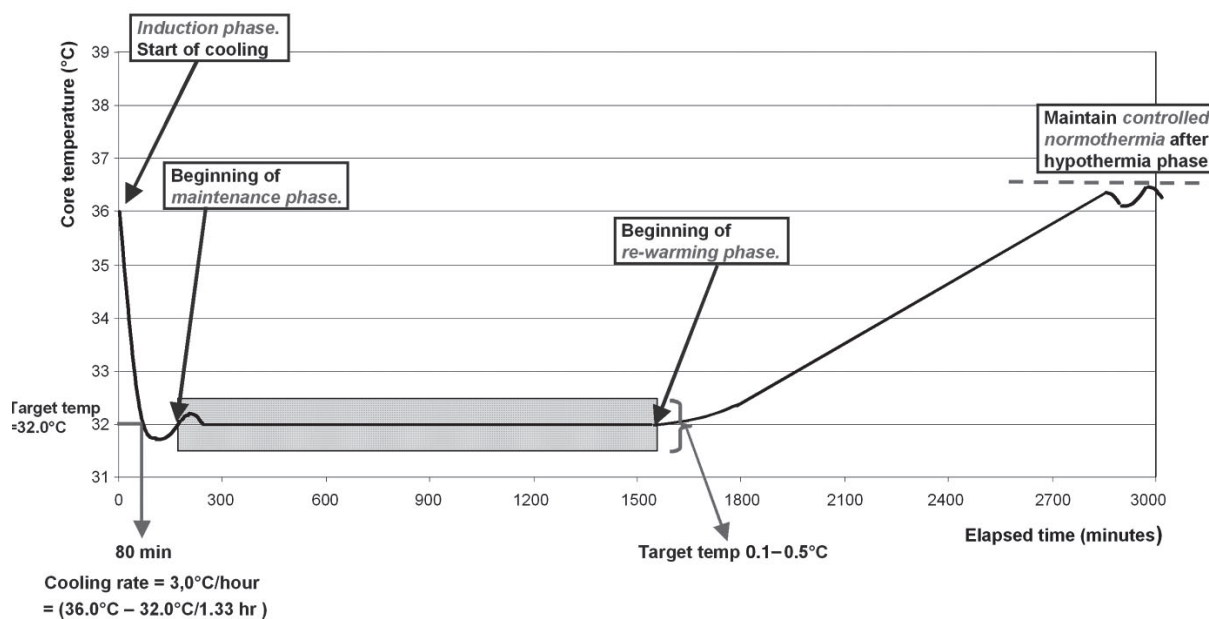


Figure 12 - Différentes phase de l'hypothermie thérapeutique (d'après ⁴²⁰).

- **Les techniques conventionnelles** comprennent la perfusion de sérum froid et l'utilisation de sacs de glace placés sur le corps. La perfusion de sérum salé isotonique froid est efficace pour induire l'hypothermie.⁴²¹ Ses principaux avantages sont sa facilité d'utilisation et son faible coût. La combinaison de perfusion de sérum et de sacs de glace permet d'atteindre la cible de 32-34°C en moins de 4 heures.⁴²² Le principal inconvénient de ces techniques est la difficulté à contrôler la cible thermique avec un risque plus élevé d'un refroidissement plus profond,⁴²³ et une plus grande difficulté à maintenir la température cible.⁴²⁴

- **Les méthodes de refroidissements de surface** sont fréquemment utilisées. Plusieurs dispositifs de refroidissement de surface sont disponibles tels que les couvertures (Blanketrol[®], Criticool[™]) et les pads refroidissants (EMCOOLS Flex.Pad[™], Arctic Sun[®], InnerCool) (figure 13). Ces systèmes sont faciles à utiliser et certains sont asservis à la température du patient permettant un meilleur contrôle de la température cible. Les pads EMCOOLS sont facilement utilisables en préhospitalier.

- **Les méthodes de refroidissement intravasculaire** sont efficaces mais invasives (Thermogard XP, InnerCool RTx). Le principe est de faire circuler du sérum froid en boucle fermée dans un cathéter. Ces systèmes sont dotés d'un rétrocontrôle automatisé de la température. On observe moins de frissons par rapport aux systèmes de refroidissement de surface.^{425,426} Malgré un meilleur contrôle thermique, une étude

rétrospective sur de faibles effectifs n'avait pas mis en évidence de différence significative sur le pronostic des patients.⁴²⁷ En 2015, dans une étude contrôlée et randomisée, Deye *et al.* ont comparé un refroidissement endovasculaire par voie fémorale à un refroidissement par méthode conventionnelle.⁴²⁸ Sur les 400 patients randomisés, les auteurs n'ont pas mis en évidence d'impact significatif sur l'état neurologique des patients à J28 malgré un meilleur contrôle thermique dans le groupe ayant bénéficié d'un refroidissement par méthode endovasculaire.

- Le refroidissement par voie nasale a été testé en 2019 (figure 13). L'une des limites de beaucoup de techniques de refroidissement est qu'elles ne peuvent pas être mises en œuvre en pré-hospitalier du fait de leur encombrement ou de leur caractère invasif. Une équipe suédoise a publié en 2010 une étude de faisabilité testant l'utilisation d'un dispositif de refroidissement pré-hospitalier par voie nasale (RhinoChill®).⁴²⁹ Un mélange de liquide refroidissant et d'oxygène à haut débit est vaporisé dans la cavité nasale ce qui entraîne un refroidissement important des voies nasales et du cerveau. Il s'agit d'un dispositif portatif qui permet son utilisation préhospitalière relayée ensuite par une méthode de refroidissement conventionnel à l'hôpital. Dans cette étude, les auteurs ont randomisé 93 patients dans le groupe avec refroidissement préhospitalier et 100 patients dans le groupe contrôle. Aucune complication grave liée au dispositif n'a été rapportée. Il permettait une baisse plus rapide de la température centrale mesurée à l'arrivée à l'hôpital : 35,1°C contre 35,8°C. De même, la cible de 34°C était atteinte en moins de 2 heures dans le groupe refroidissement nasal et en plus de 5 heures dans le groupe contrôle. L'étude PRINCESS est l'étude prospective randomisée multicentrique internationale qui a testé le dispositif sur un large effectif.¹⁷⁰ 343 patients ont été randomisés dans le groupe refroidissement par voie nasale initiée dès la RCP et 334 dans le groupe avec refroidissement par méthode conventionnelle. Une température <34°C a été atteinte en 105 minutes dans le groupe hypothermie contre 180 minutes en médiane dans l'autre groupe (p<0,001). L'étude n'a pas retrouvée de différence significative sur la survie ou le pronostic neurologique des patients à J90.

- D'autres méthodes de refroidissement sont en cours d'expérimentation telles que la ventilation totale liquide,⁴³⁰ ou le refroidissement par voie œsophagienne.^{431,432}



Figure 13 - Exemple de techniques de refroidissements externe.

A : l'Arctic Sun[®] ; B : Rhinochill[®].

3.3 - Délai d'application

Les données expérimentales suggèrent que l'hypothermie doit être instaurée le plus rapidement possible pour être cardioprotectrice,⁴³³⁻⁴³⁵ et neuroprotectrice,^{369,373} y compris après AC.^{341,342,436-438} Les données chez l'Homme apparaissent plus contrastées. Dans une étude rétrospective publiée en 2011, Haugk *et al.* ont retrouvé une association entre la rapidité d'atteinte de la cible thermique à 34°C et un mauvais pronostic neurologique.⁴³⁹ La revue de Scolletta *et al.* sur l'hypothermie thérapeutique mise en place dès la RCP, retrouve des données très limitées sur l'efficacité chez l'Homme de l'hypothermie induite dès la RCP. En effet, sur les 4 études alors publiées, seules 2 d'entre elles ont démontré un bénéfice sur le taux de RACS, aucune sur le pronostic neurologique ou la survie des patients.⁴⁴⁰ Dans une étude randomisée récente, Kim *et al.* ont étudié les effets d'une hypothermie appliquée en préhospitalier chez des patients victimes d'un AC extrahospitalier quel que soit le rythme initial.⁴⁴¹ Avec une cible à 34°C atteinte en 4,2 heures au lieu de 5,5 heures dans le groupe contrôle pour les FV, aucune différence sur la survie hospitalière ou le pronostic neurologique n'a été mise en évidence. Les auteurs ont même observé la survenue plus fréquente de récurrence d'AC et d'œdème pulmonaire dans le groupe interventionnel. En 2015, l'analyse des 7 essais contrôlés et randomisés ayant étudié l'hypothermie induite en préhospitalier conclut à l'absence d'effet démontré sur le pronostic neurologique et la survie des patients.⁵⁷ Enfin, l'étude PRINCESS évoquée précédemment a étudié l'effet du refroidissement instauré par voie nasale en préhospitalier sur le pronostic des patients après AC.¹⁷⁰ Il s'agissait principalement d'AC

de cause cardiaque avec 40% de rythme choquable. Malgré une tendance en faveur du groupe hypothermie par voie nasale, aucune différence significative n'a été observée entre les deux groupes sur le critère de jugement principal (évolution neurologique favorable à J90). Notons que le temps avant randomisation était de plus de 15 minutes dans les deux groupes et que, par ailleurs, la pertinence clinique d'un refroidissement plus rapide mais obtenu en plus d'1 heure et 30 minutes en médiane, sont probablement des éléments pouvant expliquer la négativité de l'étude.

3.4 - Durée

Les durées d'hypothermie thérapeutique sont très variables selon les études cliniques. Dans les trois études prospectives randomisées, les durées étaient de 12 heures dans l'étude australienne,⁵⁴ de 24 heures dans l'étude européenne,⁵⁵ et de 36 heures dans l'étude TTM.⁹ Ces durées varient de 4 à 48 heures dans la plupart des études.⁴⁴² Les données expérimentales suggèrent une neuroprotection plus importante lorsque l'hypothermie thérapeutique est maintenue pendant 48 heures par rapport à 24 heures.^{443,444} Chez l'Homme, une étude observationnelle rétrospective sur 79 patients n'a pas mis en évidence de différence entre une hypothermie à 33°C maintenue pendant 24 heures et une hypothermie maintenue pendant 72 heures.⁴⁴⁵ Une étude rétrospective de Kagawa *et al.* n'a pas non plus retrouvé de bénéfice à des durées prolongées de refroidissement.⁴⁴⁶ Dans une large étude récente prospective randomisée et multicentrique, Kirkegaard *et al.* ont comparé les effets protecteurs d'une hypothermie à 33°C appliquée durant 48 heures à une durée de 24 heures.⁴⁴⁷ 355 patients principalement victimes d'AC de rythme choquable ont été randomisés dans les deux groupes. La température cible était atteinte avec une médiane de 281 minutes dans le groupe 48 heures et de 320 minutes dans le groupe 24 heures ($p=0,01$). Malgré une tendance en faveur du groupe 48 heures, l'état neurologique et la survie des patients à 6 mois ne différaient pas de façon significative entre les deux groupes. Un manque de puissance de l'étude peut être évoqué. En revanche la durée de ventilation mécanique et de séjour en réanimation était plus élevée dans le groupe 48 heures.

IV - OBJECTIFS DE NOTRE TRAVAIL DE RECHERCHE

Nous avons vu que l'AC réanimé est une modalité extrême d'I/R dont la physiopathologie sous-tend le syndrome post-AC de très mauvais pronostic. Au centre de cette physiopathologie complexe, la mitochondrie joue un rôle majeur via notamment l'ouverture CypD-dépendante de son PTP. L'inhibition de l'ouverture du PTP constitue une piste de recherche prometteuse pour espérer limiter les conséquences du syndrome post-AC et améliorer le pronostic des patients.

L'hypothermie thérapeutique est le seul traitement adjuvant de la RCP qui a démontré un bénéfice sur le pronostic neurologique et la survie. Ses mécanismes d'action sont complexes et partiellement compris expliquant que ses modalités d'application (population cible, température cible, délais et durées d'application) restent débattues. Les effets de l'hypothermie sur le fonctionnement mitochondrial et le pore de transition de perméabilité ont été peu étudiés notamment dans le contexte de l'AC. Une meilleure compréhension des mécanismes mitochondriaux de l'hypothermie thérapeutique est susceptible d'aider à préciser ses modalités d'application ainsi que d'envisager de lui adjoindre d'autres thérapeutiques pour améliorer le pronostic des patients.

Devant cette problématique, les objectifs de notre travail de recherche expérimental ont donc été :

(1) d'étudier les mécanismes mitochondriaux de l'hypothermie thérapeutique sur un modèle d'AC chez le lapin,

(2) de préciser les mécanismes d'action de l'hypothermie thérapeutique sur une voie de signalisation cellulaire sur un modèle d'AC chez le lapin,

(3) de développer un modèle d'AC chez la souris reproduisant le syndrome post-AC pour permettre l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés,

(4) d'étudier le rôle de l'hypothermie thérapeutique associée à l'inhibition du mécanisme d'ouverture CypD-dépendant du PTP sur le pronostic à court terme et les altérations *in vitro* des mitochondries isolées du cœur et du cerveau,

(5) d'étudier l'influence sur le pronostic à long terme de l'association de l'hypothermie thérapeutique à l'inhibition du mécanisme CypD-dépendant d'ouverture du PTP.

MATERIEL ET METHODES

I - MODELE LAPIN D'ARRET CARDIAQUE

A - Considérations éthiques

Les expérimentations animales ont été réalisées en conformité avec les textes réglementaires français (décret n°2001-464 du 29 mai 2001 et décret n°2001-486 du 06 juin 2001) et les recommandations de l'INSERM (septembre 2002) relatifs à l'expérimentation animale et la protection des animaux de laboratoire, ainsi qu'en accord avec "*The guide for the care and use of laboratory animals*" publié par le "*US National Institute of Health*" (NIH publication No. 85-23, révisé en 1996). L'ensemble des procédures présentées dans ce travail a été approuvée par le Comité d'Ethique de l'Université Claude Bernard Lyon-Est (BH 2012-25).

B - Protocole chirurgical

Nous avons utilisé un modèle animal précédemment utilisé dans notre laboratoire.^{331,448,449} Des lapins *New-Zealand-White* (NZW) mâles (2,5-3,5 Kg) sont sédatisés par 5mg/kg de xylazine administrée par voie intramusculaire (IM) puis anesthésiés par une injection de 50mg/kg de kétamine IM. L'entretien de l'anesthésie est réalisé par une perfusion de 20 à 50 µg/minute de xylazine et 40 à 100 µg/minute de kétamine. La température de l'animal est mesurée par une sonde thermique œsophagienne et maintenue à un niveau physiologique ($39^{\circ}\text{C}\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) à l'aide d'une table chirurgicale chauffante avec thermostat. La température du bloc opératoire est maintenue à 25°C à l'aide d'une climatisation. Une trachéotomie est réalisée pour permettre l'intubation de l'animal puis la ventilation mécanique artificielle (respirateur Siemens®, Servo 900 B) avec une fraction inspirée en oxygène (FiO_2) à 30%, un volume courant à 10ml/kg et une fréquence respiratoire à 35 cycles/minute. Le CO_2 expiré ainsi que la saturation pulsée en oxygène (SpO_2) sont mesurés en continu. Un électrocardiogramme est enregistré en continu.

Après dissection, la veine jugulaire interne droite est cathétérisée et l'animal est perfusé avec du sérum salé (NaCl 0,9%) pour compenser les pertes hydriques. Un désilet de diamètre 4F est également introduit dans l'artère carotide droite afin de mesurer en continu la pression artérielle (PA) et permette la réalisation des

prélèvements sanguins. Une thoracotomie gauche est réalisée en regard du quatrième espace intercostal. Le poumon est récliné, le péricarde excisé et le cœur exposé. Une période de stabilisation de 15 minutes est ensuite respectée.

C - Arrêt cardiaque et réanimation cardio-pulmonaire

Une injection IV de bromure de pancuronium (50 µg/kg) est réalisée pour permettre un blocage neuromusculaire complet. La ventilation mécanique est ensuite arrêtée. L'absence de mouvement respiratoire est vérifiée visuellement puis est observée une baisse rapide de la SpO₂ précédant le collapsus hémodynamique suivi de l'AC hypoxique. L'AC est défini par une PAS inférieure à 10 mmHg et l'absence de contraction cardiaque visible. L'AC est respecté pendant 15 minutes avant de débiter une RCP comprenant :

- la reprise de la ventilation mécanique avec une FiO₂ à 100% pendant les 30 premières minutes,
- un massage cardiaque interne (MCI), réalisé à l'aide d'une pince à disséquer, à une fréquence de 150 à 200 compressions/min, jusqu'à l'obtention d'une RACS définie par une PAS supérieure à 30 mmHg et une fréquence cardiaque (FC) supérieure à 100 bpm pendant plus de 3 minutes,
- l'injection d'adrénaline (20 µg/kg, IV), débutée 1 minute après le début de la RCP et répétée toutes les minutes en l'absence d'activité cardiaque efficace (PAM>20 mmHg, FC >100/min).

En l'absence de RACS après 15 minutes de RCP, la réanimation est arrêtée.

D - Groupes expérimentaux

Les animaux ont été randomisés dans 5 groupes expérimentaux (figure 14) :

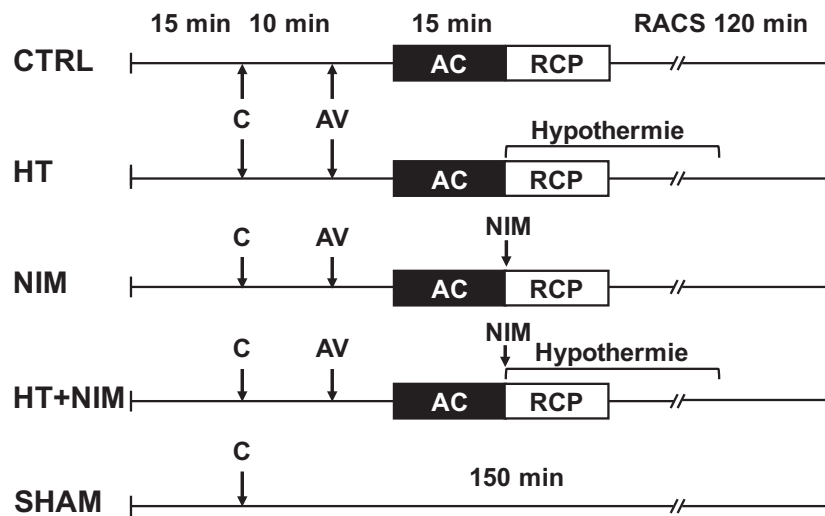


Figure 14 - Groupes expérimentaux

C : curare ; AV : arrêt ventilatoire ; AC : arrêt cardiaque ; RCP : réanimation cardio-pulmonaire ; RACS : restauration d'une activité circulatoire spontanée ; NIM : NIM811, dérivé non immunosuppresseur de la ciclosporine A ; HT : hypothermie thérapeutique.

Sham : animaux opérés dans les mêmes conditions expérimentales que les autres groupes mais sur lesquels aucune asphyxie n'est appliquée.

Contrôles (CTRL) : animaux sur lesquels un AC asphyxique est appliqué suivi d'une période de reperfusion de 120 minutes.

Post-conditionnement pharmacologique : animaux traités par N-méthyl-4-isoleucine-ciclosporine (NIM811), dérivé non immunosuppresseur de la CsA, à la dose de 2,5mg/kg IV injecté en même temps que le début de la RCP.

Hypothermie thérapeutique : animaux traités par l'application de poches de glace sur l'ensemble de la surface corporelle juste avant la RCP pour atteindre le plus rapidement possible une température cible de 32°C. Les poches de glace sont ensuite retirées et les animaux réchauffés progressivement.

II - MODELE SOURIS D'ARRET CARDIAQUE

A - Considérations éthiques

Les expérimentations animales ont été réalisées en conformité avec les textes réglementaires français (décret n°2001-486 du 06 juin 2001 et décret n°2013-118 du 01 février 2013) et les recommandations de l'INSERM (septembre 2002) relatifs à l'expérimentation animale et la protection des animaux de laboratoire, ainsi qu'en accord avec "*The guide for the care and use of laboratory animals*" publié par le "*US National Institute of Health*" (NIH publication No. 85-23, révisé en 1996). L'ensemble des procédures présentées dans ce travail a été approuvée par Comité d'Ethique en Expérimentation Animale CEEA-55 le 03 novembre 2014 et le 09 mars 2017.

B - Protocole chirurgical

Nous avons utilisé des souris mâles *wild type* (WT) et *CypD*^{-/-} de fond génétique mixte C57Bl6/SV129, âgées de 8 à 12 semaines pour un poids de 20 à 30g. Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 100mg/kg de kétamine, et 5mg/kg de xylazine. La température de l'animal est mesurée par une sonde thermique rectale asservie au thermostat de la table chirurgicale chauffante permettant de la maintenir à un niveau physiologique (37°C±0,5°C). La température du bloc opératoire est maintenue à 25°C. Une incision latéro-trachéale gauche est réalisée pour visualiser la trachée permettant de contrôler l'intubation orotrachéale réalisée avec un cathéter de 22G. La ventilation mécanique artificielle est ensuite débutée (Physiosuite[®], Kent Scientific) avec une FiO₂ à 40%, un volume courant à 6,5 µl/g, une fréquence respiratoire à 150/minute et une pression expiratoire positive à 2 cmH₂O. Le CO₂ expiré est mesuré en continu et l'électrocardiogramme enregistré. La veine jugulaire interne gauche est disséquée à travers l'incision latéro-trachéale déjà réalisée et un micro-cathéter (PE-10) purgé avec du sérum salé hépariné est introduit. Une période de stabilisation de 5 minutes est ensuite respectée.

C - Arrêt cardiaque et réanimation cardio-pulmonaire

1 - Mise au point du modèle asphyxique d'arrêt cardiaque

La plupart des modèles expérimentaux murins d'AC sont basés sur le principe d'une injection de potassium IV pour induire l'AC.⁴⁵⁰⁻⁴⁵³ Malgré une faible pertinence clinique, ces modèles se sont développés car les chercheurs ont été confrontés à des difficultés pour identifier l'instant précis de l'AC dans les modèles asphyxiques. En effet, lors d'un AC asphyxique, le cœur de la souris a la particularité de conserver une activité électrique visible sur l'ECG pendant plusieurs minutes alors même que toute activité mécanique efficace a déjà cessé.⁴⁵⁰ Lors d'une phase expérimentale préliminaire de mise au point, nous avons confirmé ce phénomène de dissociation électromécanique de plusieurs minutes. Afin de surmonter cette difficulté, nous avons utilisé l'ETT pour observer le moment précis où le myocarde cesse d'avoir une activité cardiaque efficace. Cette technique s'est avérée plus fiable que la mise en place d'une sonde de micromanométrie de 1F (Millar®) dans la carotide interne droite dont le signal pouvait indiquer de façon trop précoce l'AC.

Pour induire un blocage neuromusculaire complet, nous avons d'abord testé l'atracium et le cisatracurium, curares les plus utilisés chez l'Homme, et dont les durées d'actions courtes et la pharmacologie en faisaient des molécules de choix. Néanmoins, malgré des essais à des posologies croissantes, ces 2 molécules n'entraînaient pas des blocs neuromusculaires suffisants chez la souris pour permettre l'arrêt total des mouvements respiratoires. Nous avons donc testé la succinylcholine dont la durée d'action très courte était également adaptée pour éviter toute curarisation résiduelle et permettre l'extubation des souris dans le protocole correspondant. Après plusieurs essais à différentes posologies, la dose de 1mg/kg (identique à celle utilisée chez l'Homme) s'est avérée être la dose minimale efficace chez la souris.

Plusieurs durées d'AC ont été testées : 4, 5, 7 et 8 minutes. Nous avons retenu une durée d'AC de 5 minutes car elle entraînait des lésions d'ischémie-reperfusion tout en assurant un taux de succès de réanimation éthiquement acceptable.

2 - Mise au point de la réanimation cardio-pulmonaire

2.1 - Massage cardiaque externe

Afin de mettre au point un modèle susceptible de pouvoir étudier la survie des animaux à long terme, nous avons choisi de réaliser le massage cardiaque par voie externe afin d'éviter une thoracotomie. Une phase de mise au point a permis de s'assurer de la reproductibilité de la technique de MCE avec l'index de la main droite ainsi que d'établir son rythme à 300-350/minute. L'utilisation de l'écho-repérage de la zone précise sur laquelle appliquer le MCE avec l'index a permis d'améliorer l'efficacité et la reproductibilité de la technique. Un seul expérimentateur a réalisé l'ensemble des MCE pour éviter toute variabilité inter-expérimentateur.

2.2 - Adrénaline

En conformité avec les recommandations chez l'Homme,³⁹ nous avons utilisé l'injection IV d'adrénaline pour favoriser la RACS. A l'aide des données issues des modèles d'AC murins publiés, nous avons testé différentes posologies lors de la phase de mise au point. La dose de 0,1 mg/kg est la dose minimale efficace que nous avons retenue. Une seule injection d'adrénaline est réalisée car les injections supplémentaires se sont avérées inutiles, c'est à dire n'augmentant pas les chances de succès de la RCP.

2.3 - Correction de l'acidose métabolique

La phase de mise au point nous a permis de réaliser des gaz du sang artériels dans les minutes qui suivaient la RACS. Nous avons constaté une acidose métabolique profonde et des hyperkaliémies sévères. La mise en place durant les premières minutes de la RACS d'une hyperventilation ainsi que l'injection IV d'une solution de bicarbonate de sodium nous ont permis de contrôler ces anomalies métaboliques et d'augmenter le taux de succès de réanimation.

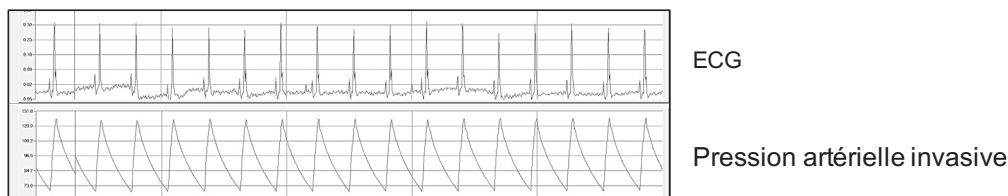
3 - Description

La figure 15 présente des exemples d'enregistrement de tracés ECG et de pression invasive observés lors de la procédure d'AC. Une injection IV de 1mg/kg de succinylcholine est réalisée par le micro-cathéter jugulaire. Après 2 minutes d'attente, la ventilation artificielle est interrompue. L'absence de mouvement respiratoire est vérifiée visuellement et l'AC est confirmé par ETT. L'AC est alors respecté pendant une période de 5 minutes avant que ne soit appliquée une RCP comprenant :

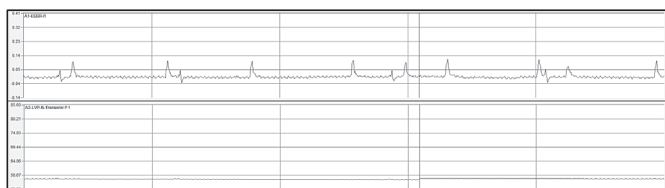
- la reprise de la ventilation mécanique avec une FiO₂ à 40% et une fréquence respiratoire à 220/minute pendant les 15 premières minutes,
- un MCE réalisé avec l'index, à une fréquence de 300 à 350 compressions/minute, jusqu'à l'obtention d'une RACS définie par un rythme organisé à plus de 200 bpm et un doublement du chiffre l'EtCO₂ mesuré pendant le MCE, confirmation de la RACS est immédiatement confirmée par une ETT,
- une injection unique d'adrénaline (0,1 µg/g, IV) débutée pendant la RCP,
- une injection de 0,2 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 2,1% réalisée durant la première heure suivant la RACS.

En l'absence de RACS après 5 minutes de RCP, la réanimation est arrêtée.

A. Avant arrêt cardiaque



B. Arrêt cardiaque



C. RACS

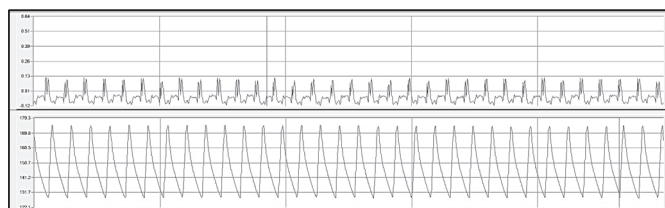


Figure 15 - Exemples d'enregistrements de tracés hémodynamiques

D - Groupes expérimentaux

Dans un premier protocole (protocole 1), les animaux sont sacrifiés à 150 minutes de reperfusion pour permettre un prélèvement sanguin ainsi que les prélèvements du cœur et du cerveau pour l'étude des mitochondries.

Dans un second protocole (protocole 2), le cathéter est enlevé et la plaie suturée. Les animaux sont sevrés de la ventilation mécanique invasive puis remis en cage (avec un accès libre à l'eau et à l'alimentation) pour réalisation d'une IRM cérébrale à J1 et étude de la survie jusqu'à J7. Après leur extubation, une injection de 0,2 ml de bicarbonate de sodium à 2,1% et une injection de 0,3 ml de sérum salé à 0.9% sont réalisées par voie sous-cutanée (SC). Des injections SC de 0,5ml de sérum salé à 0,9% sont ensuite réalisées deux fois par jour les jours suivants pour assurer un bon état d'hydratation de l'animal.

Les animaux ont été randomisés dans les groupes expérimentaux suivants (figure 16) :

Sham : animaux opérés dans les mêmes conditions expérimentales que les autres groupes mais sur lesquels aucune asphyxie n'est appliquée.

Contrôles (CTRL) : animaux sur lesquels un AC asphyxique est appliqué suivi d'une période de reperfusion de 150 minutes (protocole 1) ou d'une étude de la survie jusqu'à J7 (protocole 2). Ces animaux possèdent le même fond génétique que les animaux KO.

CypD^{-/-} : animaux génétiquement modifiés n'exprimant pas la CypD (CypD-KO) sur lesquels le même protocole d'AC que les animaux CTRL est appliqué.

Hypothermie thérapeutique : animaux traités par l'application d'un linge trempé d'eau glacée sur l'ensemble de la surface corporelle juste avant la RCP pour atteindre le plus rapidement possible une température cible de 33°C. Réglage également de la table chirurgicale asservie à une cible de 33°C avec sonde thermique IR. Le linge glacé est ensuite retiré et les animaux sont réchauffés progressivement (0,3-0,4°C/5 minutes).

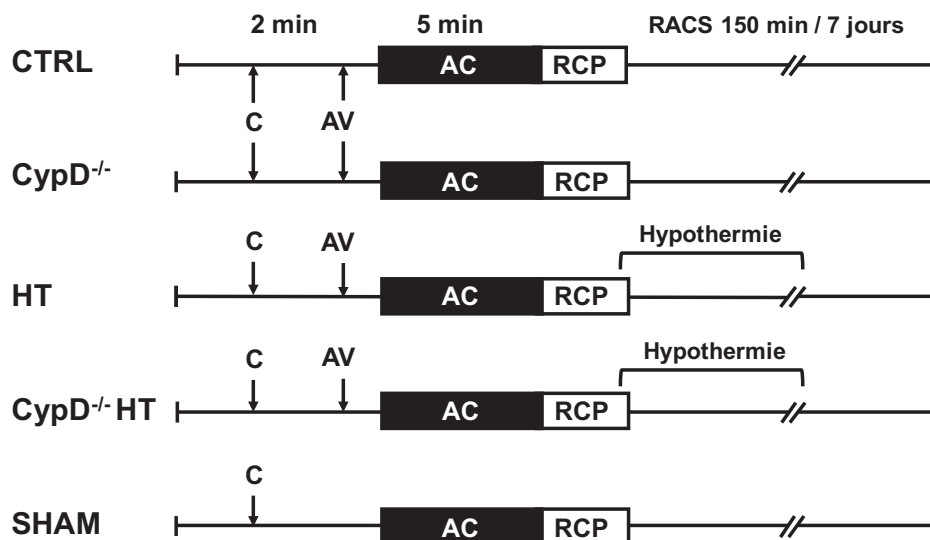


Figure 16 - Groupes expérimentaux

C : curare ; AV : arrêt ventilatoire ; AC : arrêt cardiaque ; RCP : réanimation cardio-pulmonaire ; RACS : restauration d'une activité circulatoire spontanée ; CypD^{-/-} : CypD KO ; HT : hypothermie thérapeutique.

III - TECHNIQUES UTILISEES

A - Hémodynamique

1 - Pression aortique

La pression aortique est mesurée à l'aide d'un cathéter inséré dans la carotide et d'un capteur de pression à transduction hydraulique. Le zéro de pression est réalisée en plaçant le capteur au niveau de l'oreillette gauche.

2 - Echocardiographie

Les mesures échocardiographiques sont réalisées chez le lapin anesthésié après la réalisation d'une thoracotomie gauche et d'une ouverture du péricarde permettant d'exposer le VG. Un gel de silicone de 1,5 cm d'épaisseur est apposé entre la face antérieure du VG et la sonde d'échographie (sonde à balayage linéaire de 7-MHz, GE Medical System). Sur la coupe petit axe du VG passant par les muscles papillaires, on mesure par la méthode Simpson la surface du VG en télé-systole (SVGTS) et en télé-diastole (SVGTD). Ces données permettent de calculer la fraction de raccourcissement de surface du VG (FRSVG) exprimée en % selon la formule : $FRSVG = (SVGTD/SVGTS)/SVGTD$.

Les mesures échocardiographiques sont réalisées chez la souris anesthésiée de façon non-invasive par voie transthoracique. La face antérieure du thorax est épilée et le gel d'échographie déposé pour permettre l'acquisition des images à l'aide d'une sonde à balayage linéaire de 13-MHz (GE Medical System). La mesure de la FRSVG est réalisée selon la même technique que celle décrite dans le modèle lapin.

B - Evaluation neurologique

1 - Réactivité pupillaire

La réactivité pupillaire à la lumière, qui permet une estimation des lésions cérébrales après AC, a été définie comme étant présente lorsque les pupilles se contractent de plus de 1 mm.

2 - Score neurologique

Nous employons un score d'évaluation neurologique après AC chez la souris validé dans la littérature (tableau 7).⁴⁵⁰ Ce score est réalisé à J1 par un expérimentateur en aveugle.

Tableau 7 - Score d'évaluation neurologique après AC chez la souris.

Level of consciousness	
1. No reaction to pinching of tail	0
2. Poor response to tail pinch	1
3. Normal response to tail pinch	2
Corneal reflex	
1. No blinking	0
2. Sluggish blinking	1
3. Normal blinking	2
Respirations	
1. Irregular breathing pattern	0
2. Decreased breathing frequency, normal pattern	1
3. Normal breathing frequency and pattern	2
Righting reflex	
1. No turning attempts	0
2. Sluggish turning	1
3. Turns over spontaneously and quickly	2
Coordination	
1. No movement	0
2. Moderate ataxia	1
3. Normal coordination	2
Movement/activity	
1. No spontaneous movement	0
2. Sluggish movement	1
3. Normal movement	2
Total possible score	12

3 - IRM cérébrale

Les IRM cérébrales chez la souris sont réalisées à J1 dans tous les groupes expérimentaux (figure 17). Immédiatement avant l'examen, une injection intrapéritonéale de 50mg/kg de kétamine et de 2,5 mg/kg de xylazine sont réalisées. La température de l'animal est maintenue à $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ au moyen d'une table d'examen réchauffée par un circuit d'eau. Le museau de la souris est placé dans une canule apportant de l'air enrichi en oxygène. Une IRM 7T BRUKER BioSpec (Bruker Biospin MRI GbmH Bruker) a été utilisée. Les cartes de coefficient de diffusion apparent (CDA) ainsi que les cartes paramétriques T2 ont été reconstruites à l'aide du logiciel de post-traitement d'imagerie de BRUKER (ParaVision 5.1). Pour l'interprétation des images, nous avons créé un score d'intégrité cérébrale simple et facile à utiliser basé sur des images pondérées en T2 et une analyse de la cartographie CDA : 1 lésion vaut 1 point, 2 lésions ou plus valent 2 points, le caractère bilatéral vaut 1 point et la présence des lésions sur plus d'une coupe vaut 1 point. Les images cérébrales IRM ont été interprétées par deux investigateurs en aveugle.

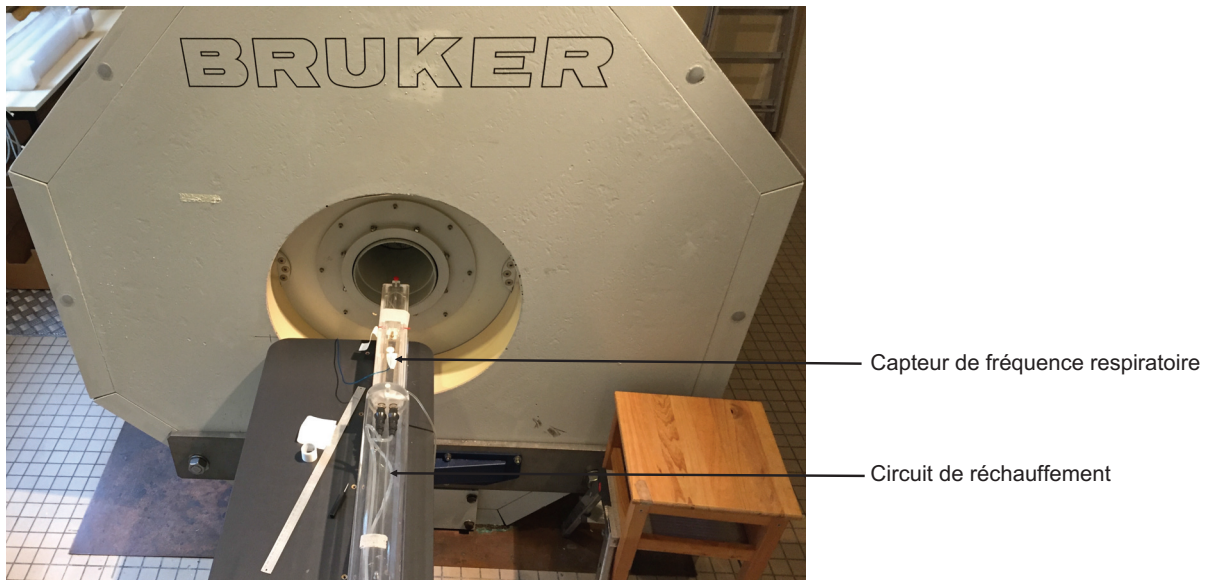


Figure 17 - Photographie du dispositif pour réalisation des IRM cérébrales

C - Analyses biochimiques

Une partie des dosages biochimiques est réalisée dans le laboratoire clinique du Groupement Hospitalier Centre (Hôpital Edouard Herriot), Hospices Civils de Lyon. Les autres dosages sont réalisés dans le laboratoire INSERM U1060.

Les dosages d'alanine-aminotransférase (ALAT) (IFCC, cinétique à 37°C avec phosphate de pyridoxal) et créatinine (réaction de Jaffé) sont réalisés sur des tubes à héparinate de lithium avec gel (Minicollect®) à l'aide d'un analyseur Modular P (Roche Diagnostics). La troponine Ic (méthode immuno-enzymatique et mesure luminométrique) est dosée sur un analyseur Access 2 (Beckman Coulter®). La lactatémie, prélevée sur tubes à fluorure de sodium (Minicollect®), est dosée par méthode enzymatique (cinétique à 37°C) sur un analyseur Hitachi 912 (Roche Diagnostics). Les gaz du sang sont immédiatement analysés sur un appareil de gazométrie (GEM 3000). Les taux plasmatiques de troponine Ic et S100β sont mesurés par technique ELISA selon les recommandations du fabricant (Abnova®).

D - Analyses des mitochondries

1 - Isolation des mitochondries

1.1 - Mitochondries myocardiques

La paroi antérieure du ventricule gauche (VG) est rincée et conservée dans une solution tampon contenant du saccharose 70mM, du mannitol 210 mM, de l'EGTA (acide éthylène-glycol-tétraacétique) 1mM dans du Tris/HCl 50 mM, pH 7,4 à 4°C. Toutes les manipulations sont réalisées à 4°C. Le prélèvement myocardique est coupé finement aux ciseaux dans le même tampon (10 ml/g). Un broyage mécanique est réalisé à l'aide d'un broyeur verre-verre Kontes™ et/ou d'un homogénéiseur verre-teflon Elvejem. Les mitochondries sont isolées par centrifugations différentielles.^{256,331} L'homogénat est soumis à une première centrifugation (3 minutes, 3000 x g) permettant d'éliminer les noyaux, hématies et autres débris cellulaires. Le surnageant post-nucléaire obtenu est filtré puis centrifugé (10 minutes, 10000 x g) pour isoler le surnageant mitochondrial. Le culot mitochondrial est rincé dans le tampon dépourvu d'EGTA et remis en suspension dans 500 µl de ce même tampon. Un dosage des protéines par la méthode de Bradford est ensuite réalisé avec la *Bovine Serum Albumin* (BSA) comme standard.⁴⁵⁴

1.2 - Mitochondries cérébrales

Le tissu cérébral prélevé est placé dans un tampon à 4°C identique à celui précédemment décrit. L'homogénat est centrifugé une première fois à 1300 x g pendant 3 minutes. Le surnageant post-nucléaire sera lui centrifugé à 5500 x g pendant 10 minutes. Les culots de mitochondries sont rincés et suspendus dans le même tampon d'isolation dépourvu d'EGTA.

2 - Mesure de la capacité de rétention calcique mitochondriale

Rappelons que la CRC consiste à mesurer *in vitro* la libération massive de Ca^{2+} dans le milieu extra-mitochondrial après une surcharge calcique progressive reflétant

l'ouverture du PTP des mitochondries.⁴⁵⁵ Les protéines mitochondriales (250 µg pour le myocarde et 500 µg pour le cerveau) sont mises en suspension dans une mini-cuve à 25°C contenant un tampon (saccharose 150 mM, KCl 50 mM, KH₂PO₄ 2mM, succinate 5mM dans du Tris/HCl 20 mM, pH 7.4). Une sonde fluorescente Calcium Green-5N (0,5µM) (Molecular Probes™) est ajoutée pour permettre la mesure du contenu extra-mitochondrial en Ca²⁺ par méthode fluorimétrique (spectrofluorimètre Hitachi F2500 et F7000, longueur d'émission 500nm et réception 530nm). Des injections de 10 nmol de CaCl₂ sont réalisées toutes les minutes. L'ouverture du pore est visualisée lors d'une augmentation brutale du Ca²⁺ extra-mitochondrial sans retour à l'état basal. La CRC est exprimée en nmol CaCl₂/mg de protéines mitochondriales et correspond donc à la quantité de calcium administrée *in vitro* nécessaire pour obtenir l'ouverture du PTP.

3 - Mesure de la consommation d'oxygène mitochondrial

La mesure de la consommation d'oxygène est réalisée *in vitro* à l'aide d'un oxygraphe muni de deux électrodes de Clark (Oroboros™). Les mitochondries (250µg) sont incubées dans 2mL de tampon (100mM KCl, 50mM MOPS, 1mM EGTA, 5mM KH₂PO₄ et 1mg/mL BSA, pH 7.4) avec du GMP (Glutamate, Malate, Pyruvate 5mM chacun) substrat du complexe I de la chaîne respiratoire ou du succinate 10 mM substrat du complexe 2 et de la roténone 1µM, un inhibiteur de la chaîne respiratoire. L'état 3 (activité maximale du complexe I) est enregistré en présence d'ADP 200 µM. Le retour à une consommation faible d'oxygène après consommation totale de l'ADP définit l'état 4. La consommation d'oxygène par les mitochondries est exprimée en nmole O₂/min/mg protéines. L'indice du couplage respiratoire (RCI) est défini comme le rapport de l'état 3/état 4 du complexe I.

E - Western blot et immunoprécipitation (modèle lapin)

1 - Extraction tissulaire

L'hémisphère cérébral droit et la paroi antérieure du VG préalablement congelés à -80°C sont broyés finement à l'aide d'un pilon sur une cupule baignant

dans l'azote liquide. La poudre obtenue est homogénéisée dans un tampon hypotonique de lyse classique RIPA (NaCl 150mM, Triton X100 1%, sodium désoxycholate 0.5%, Tris 50mM) complété avec EDTA 5mM, DTT 1mM, Na₃VO₄ 1mM et NaF 20mM. Les protéines cytosoliques sont extraites à l'aide d'un kit selon les consignes du fabricant (Extract Kit, Active Motif[®]). Les protéines des échantillons sont dosées à l'aide d'un kit de dosage BCA (Interchim[®]).

2 - Western blot

Les protéines sont dénaturées dans du Laemmli à 95°C. Elles sont ensuite séparées sur un gel de polyacrylamide dans des conditions dénaturantes (SDS-PAGE) (6-20%). Après migration des échantillons sur gel d'agarose SDS-PAGE, le transfert est réalisé sur un Trans-blot[®] Turbo[™] transfert (Biorad) sur membrane de nitrocellulose. Après un blocage de 2 heures (Lait 5% + TBS-Tween 0.1% ou BSA 5% + TB-tween 0.05% selon les anticorps utilisés), l'anticorps primaire est ajouté et incubé pendant la nuit à 4°C. Après une série de lavages, l'anticorps secondaire couplé à l'HRP (*Horseradish Peroxidase*) est ajouté et mis à incuber pendant 1 heure à température ambiante. Après une série de lavages, l'utilisation d'un kit ECL prime (GE Healthcare) permet de révéler les protéines d'intérêt à l'aide d'une caméra à détection chimioluminescente (Chemidoc[™]XRS-System, Biorad). Après révélation, les anticorps peuvent être découplés de la membrane par incubation 20 minutes dans une solution de *Re-Blot Plus Strong* (Millipore[®]) suivi de lavages. La membrane peut ensuite de nouveau être saturée puis hybridée avec un autre anticorps. La quantité de protéines a été analysée à l'aide du logiciel ImageLab[®] (Biorad) en évaluant le nombre de pixel.

2 - Immunoprecipitation

Une quantité de 500 µg de protéines issues des lysats de coeur et de cerveau est nécessaire pour la réalisation de l'immunoprécipitation. Les billes magnétiques couplées à des protéines G (Millipore[®]) sont préparées (50 µL de billes/échantillons) et lavées 3 fois avec le tampon du SLB complet (Standard Lysis Buffer NP40 1%, Trishydroxyméthyl 20mM, NaCl 138mM, KCl 2.7mM, MgCl₂ 1mM, glycérol 5% pH 8

complété avec EDTA 5mM, DTT 1mM, Na₃VO₄ 1mM, NaF 20 mM). Afin de réaliser un « *pre-clear* » et enlever le bruit de fond, 5µL de billes sont incubées avec chaque échantillon durant 30 minutes à 4°C. Les billes sont ensuite précipitées contre un aimant et le lysat récupéré. On ajoute alors l'anticorps anti-lysine acétylée aux échantillons qui sont placés à 4°C en rotation constante durant une nuit. Après une nuit d'incubation, 50 µL de billes magnétiques préparées la veille sont ajoutées à chaque échantillon pour une durée de deux heures afin d'immunoprécipiter les complexes immuns. Les billes magnétiques sont ensuite récupérées après dépose sur un portoir aimanté et lavées 3 fois au SLB complet. Les échantillons sont dénaturés par l'ajout de 30 µL de Laemmli 2X, par passage au vortex durant 30 secondes et chauffage à 95°C durant 5 minutes. Les échantillons sont déposés sur un gel afin de réaliser un Western Blot selon la procédure décrite ci-dessus.

IV - REACTIFS UTILISES

La N-méthyl-4-isoleucine-ciclosporine ou NIM811 a été gracieusement fournie par la laboratoire Novartis. La molécule a été dissoute dans un mélange d'éthanol (94%) et de Cremophor[®] EL (*polyethoxylated castor oil*) pour un usage *in vivo*. Les autres réactifs sont fournis par Sigma Chemical. Les anticorps utilisés sont : anti-lysine acétylée (Cell Signaling Technology[®]), anti-CypD (Calbiochem[®]), anti-akt et anti-phospho Akt (Cell Signaling Technology[®]), anti-ERK1/2 et anti-phospho ERK1/2 (R&D Systems), anti-VDAC (Abcam[®]). Les anticorps secondaires sont fournis par Amersham (GE Healthcare).

V - ANALYSES STATISTIQUES

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard ou en nombre (pourcentage). Les variables qualitatives ont été analysées par un test exact de Fisher ou un test du X^2 selon le cas échéant. La normalité de la distribution a été testée par le test de Kolmogorov-Smirnov. Les variables continues sans mesures répétées sont comparées par une analyse de variance (ANOVA) ou un test de Kruskal-Wallis selon le cas échéant. L'analyse des autres variables continues est réalisée par ANOVA à

deux voies pour mesures répétées. L'analyse de Kaplan-Meier et le test du log-rank ont été utilisés pour calculer et comparer les taux de survie. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (Graphpad Software). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS ET DISCUSSION

Etude n°1


Minor Changes in Core Temperature Prior to Cardiac Arrest Influence Outcomes: An Experimental Study

Martin Cour, **Vincent Jahandiez**, Joseph Loufouat, Michel Ovize,
Laurent Argaud

Publiée dans *Journal of Cardiovascular Pharmacology and
Therapeutics*

Minor Changes in Core Temperature Prior to Cardiac Arrest Influence Outcomes: An Experimental Study

Martin Cour, MD, PhD^{1,2,3}, Vincent Jahandiez, MD^{1,2,3},
Joseph Loufouat, PhD³, Michel Ovize, MD, PhD^{3,4},
and Laurent Argaud, MD, PhD^{1,2,3}

Journal of Cardiovascular
Pharmacology and Therapeutics
1-7
© The Author(s) 2014
Reprints and permission:
sagepub.com/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1074248414562911
cpt.sagepub.com


Abstract

Aim: To investigate whether slight variations in core temperature prior to cardiac arrest (CA) influence short-term outcomes and mitochondrial functions. **Methods and Materials:** Three groups of New Zealand White rabbits ($n = 12/\text{group}$) were submitted to 15 minutes of CA at 38°C (T-38 group), 39°C (T-39), or 40°C (T-40) and 120 minutes of reperfusion. A Sham-operated group ($n = 6$) underwent only surgery. Restoration of spontaneous circulation (ROSC), survival, hemodynamics, and pupillary reactivity were recorded. Animals surviving to the end of the observation period were euthanized to assess fresh brain and heart mitochondrial functions (permeability transition and oxidative phosphorylation). Markers of brain and heart damages were also measured. **Results:** The duration of asphyxia required to induce CA was significantly lower in the T-40 group when compared to the T-38 group ($P < .05$). The rate of ROSC was $>80\%$ in all groups ($P = \text{nonsignificant [ns]}$). Survival significantly differed among the T-38, T-39, and T-40 groups: 10 (83%) of 12, 7 (58%) of 12, and 4 (33%) of 12, respectively (log-rank test, $P = .027$). At the end of the protocol, none of the animals in the T-40 group had pupillary reflexes compared to 8 (67%) of 12 in the T-38 group ($P < .05$). Troponin and protein S100B were significantly higher in the T-40 versus T-38 group ($P < .05$). Cardiac arrest significantly impaired both inner mitochondrial membrane integrity and oxidative phosphorylation in all groups. Brain mitochondria disorders were significantly more severe in the T-40 group compared to the T-38 group ($P < .05$). **Conclusion:** Small changes in body temperature prior to asphyxial CA significantly influence brain mitochondrial functions and short-term outcomes in rabbits.

Keywords

cardiopulmonary resuscitation, temperature, mitochondria, mitochondrial permeability transition pore, ischemia–reperfusion

Introduction

More than 500 000 unexpected cardiac arrests (CAs) occur annually in the United States and almost as many in Europe.^{1,2} Prognosis remains poor with less than 10% of CA victims discharged from the hospital.^{1,3-5} For decades, it has been known that an unwitnessed CA, an initial rhythm categorized as not shockable (ie, asystole and pulseless activity), and a long delay between collapse and cardiopulmonary resuscitation (CPR) are the most important factors associated with death or irreversible neurologic damage.⁶ Recently, postresuscitation fever has also been identified as an independent risk factor for poor outcome.^{7,8}

The consequence of a resuscitated CA is the interruption, followed by the restoration, of blood flow to all organs, which represents a global ischemia–reperfusion (I/R) insult. In this setting, a growing body of evidence suggests that mitochondrial dysfunctions trigger I/R injury, particularly in both the brain and the heart.⁹⁻¹³ We, as well as others, have previously reported that the opening of a calcium-sensitive megachannel located in the inner membrane of the mitochondria, called the

mitochondrial permeability transition pore (mPTP), is a key event in the pathophysiology of post-CA syndrome.^{10,12,13} Consistent evidence in models other than CA has shown that small changes in temperature during I/R strongly influence the extent of injuries in both the brain and the heart.¹⁴⁻²⁰ In

¹ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Service de Réanimation Médicale, Lyon, France

² Faculté de médecine Lyon-Est, Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon, France

³ INSERM UMR 1060, CarMeN, Lyon, France

⁴ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Est, Explorations Fonctionnelles Cardiovasculaires & Centre d'Investigations Cliniques de Lyon, Lyon, France

Manuscript submitted: September 24, 2014; **accepted:** October 15, 2014.

Corresponding Author:

Laurent Argaud, Service de Réanimation Médicale, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France.
Email: laurent.argaud@chu-lyon.fr

experimental CA, decreasing temperature during CA (ie, before restoration of spontaneous circulation [ROSC]) should be highly protective.²¹ The general consensus is that temperature alters resistance to ischemia by modulating cellular metabolism.^{22,23} However, it has also recently been shown that a small temperature decrease during I/R insults limits brain and cardiac damage by preventing both mPTP opening and oxidative phosphorylation impairment.^{11,20} The aim of the present study was to investigate how small changes in body temperature prior to CA may influence both mitochondrial functions and outcomes.

Methods and Materials

The investigation conformed to French laws and the revised "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" by the Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council (National Academy Press, Washington, DC, 1996). All experiments were approved by the Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research.

Animal Preparation

Male New Zealand White rabbits (2.5-3.5 kg) were anesthetized by intramuscular injection of xylazine (5 mg/kg) and ketamine (50 mg/kg), as described previously.^{10,13} An intravenous (iv) injection infusion of a mixture of xylazine (25 µg/kg/min) and ketamine (50 µg/kg/min) was then maintained throughout the experiment. A tracheotomy was performed, and rabbits underwent mechanical ventilation with 30% oxygen.

A 16G catheter was inserted into the right jugular vein for administration of drugs and fluids. Another 16G catheter was inserted in the right internal carotid artery to measure aortic blood pressure. A left thoracotomy was performed in the fourth left intercostal space to expose the heart. A 15-minute stabilization period was then observed before experimentation.

Cardiac Arrest and Resuscitation

Rabbits were paralyzed with an iv injection of pancuronium bromide (50 µg/kg). As previously reported in our well-validated model of rabbit CA, primary asphyxial CA was induced by the withdrawal of mechanical ventilation after curarization.^{10,13} After 15 minutes of untreated CA, resuscitation was started with the resumption of mechanical ventilation with 100% oxygen, open chest cardiac massage with dissecting forceps (≈200 bpm), and iv administration of epinephrine (20 µg/kg) every 3 to 5 minutes until ROSC.¹⁰ All heart massages were performed by the same investigator.

Restoration of spontaneous circulation was defined as the return of an organized cardiac rhythm for at least 2 minutes, with mean arterial pressure (MAP) >15 mm Hg and end-tidal CO₂ (EtCO₂) >15 mm Hg. Resuscitative efforts were stopped, and the animal was declared dead if the EtCO₂ was less than

10 mm Hg for more than 5 minutes or in the absence of ROSC after 30 minutes of CPR.

Experimental Protocol

After the stabilization period, animals were randomly assigned to 1 of the 4 following groups: Sham-operated group (surgery without CA), T-38, T-39, or T-40 groups. These groups correspond to the body temperatures at which the CA was performed (38°C, 39°C, and 40°C, respectively) and which were stabilized by means of a heating lamp or ice packs, as appropriate. In all CA groups, CPR was followed by 120 minutes of reperfusion. Normothermia was defined in the rabbits as a physiologic esophageal temperature of 39°C.²⁴

Measures

Heart rate (HR) and MAP were continuously monitored on a multichannel recorder (Model 4000; Gould Inc, Cleveland, Ohio) and saved on a personal computer-based data acquisition system supported by IOX software (IOX 1.567; Emka Technologies, France). Esophageal temperature was also continuously monitored (Monitor 1165A; Hewlett Packard, Louisville, Kentucky). The EtCO₂, used as a surrogate marker of cardiac output, was also monitored.²⁵

The duration of asphyxia before CA, the occurrence of ROSC, the duration of heart massage before ROSC, the epinephrine dose required to obtain the first ROSC episode, and the duration of survival were all recorded. Pupillary reactivity to light, a rough functional estimate of cerebral damage after CA, was defined as present when pupils constricted more than 1 mm.²⁶

Preparation of Brain and Heart Isolated Mitochondria

Animals surviving to the end of the observation period (ie, 120 minutes after CA) were euthanized, and fresh mitochondria were isolated from the brain and heart tissue. As previously described, mitochondria from the left ventricular anterior wall and the left side of the cerebral cortex were isolated by differential centrifugation in cold isolation buffer containing 70 mmol/L sucrose, 210 mmol/L mannitol, and 1 mmol/L EGTA in Tris/HCL, pH 7.4 and resuspended in the same buffer devoid of calcium chelating agent.^{10,13,27-29} Mitochondria were kept over ice prior to experiments.

Calcium Retention Capacity and oxidative Phosphorylation

The calcium retention capacity (CRC), which is an index of the resistance of the mPTP to opening following matrix Ca²⁺ accumulation, was determined on fresh mitochondria using the calcium-sensitive probe calcium green-5N (Molecular Probes, Eugene, Oregon), as described previously.^{10,13,27} Oxygen consumption was determined by the polarographic method of Chance and Williams using a Clark oxygen electrode. State 3

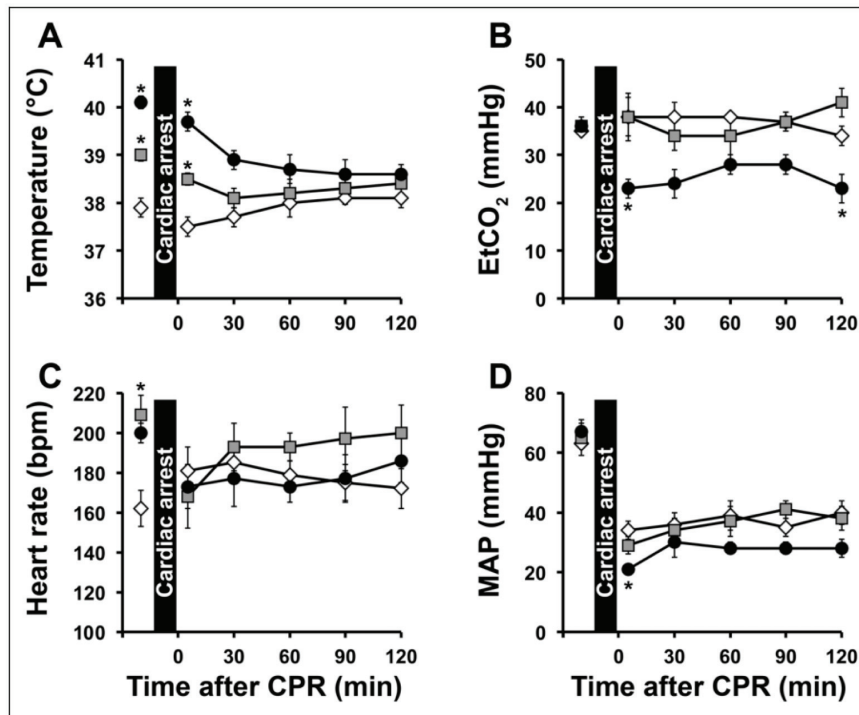


Figure 1. Temperature and hemodynamics. Temperature (panel A), end-tidal CO₂ (EtCO₂, panel B), heart rate (panel C), and mean arterial pressure (MAP, panel D) were plotted according to time at baseline and following restoration of spontaneous circulation. T-38, T-39, and T-40 indicate the groups of rabbits with a core temperature at 38°C, 39°C, and 40°C prior to cardiac arrest (CA), respectively (n = 12/group). *P < .05 versus T-38 group.

(adenosine diphosphate [ADP] stimulated), state 4 (ADP limited), and respiratory control index (RCI: state 3/state 4) were determined by oxygraphy (Oroboros Oxygraph, Paar, Austria), as described previously.^{10,13,27,30} Electron donors to complex I (glutamate 5 mmol/L and malate 5 mmol/L) were used for both CRC and respiration assays.

Biochemical Markers of Cardiac and Brain Damages

At the end of the protocol, troponine Ic was measured at an off-site reference laboratory. Blood level of protein S100B, a marker of neuronal lysis, was also determined after 120 minutes of reperfusion, by using an ELISA test, according to the manufacturer's instructions (KA0037; Abnova, Jhongli-city, Taiwan).³¹

Statistical Analysis

Results were analyzed with the Graphpad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, California). Data were expressed as mean ± standard error of the mean or number (%). Comparisons of categorical variables were performed using 2-sided Fisher exact test. Normality of continuous data was assessed using the Kolmogorov-smirnov test, and continuous variables were compared using 1-way analysis of variance (ANOVA) or by the Kruskal-Wallis test, as appropriate.

Comparisons between time-based measurements within each group were performed with 2-way ANOVA with repeated measures on 1 factor. The effect of different temperatures on survival was compared using Kaplan-Meier survival curves (long-rank test). Statistical significance was defined as a value of P < .05.

Results

Forty-two rabbits were used in this study (Sham: n = 6, T-38: n = 12, T-39: n = 12, and T-40: n = 12). The baseline temperature of the animals was 38.8°C ± 0.2°C. As intended, temperature at the onset of CA was significantly different (P < .05) among the 3 experimental groups (Figure 1).

Cardiac Arrest, Resuscitation, and Outcomes

As presented in Table 1, the duration of asphyxia before CA was significantly lower in the T-40 group (P < .05 compared to T-39 and T-38). The rate of ROSC was >80% in the 3 groups (P = ns). Among survivors, the dose of epinephrine and the CPR time to ROSC did not differ significantly (P = ns). Ventricular fibrillation during resuscitation was recorded in 0, 1, and 3 rabbits in the T-38, T-39, and T-40 groups, respectively (P = ns). Although 10 (83%) of the 12 rabbits survived after

Table 1. Cardiopulmonary Resuscitation.

	Asphyxia, s	Heart massage, s	Epinephrine, µg/kg	ROSC, n (%)
T-38	416 ± 14	130 ± 22	27 ± 5	12/12 (100)
T-39	372 ± 9	211 ± 68	31 ± 5	11/12 (92)
T-40	319 ± 10 ^{a,b}	242 ± 57	39 ± 4	10/12 (83)

Abbreviation: ROSC, Restoration of spontaneous circulation.

^a*P* < .05 versus T-38 group.

^b*P* < .05 versus T-39 group.

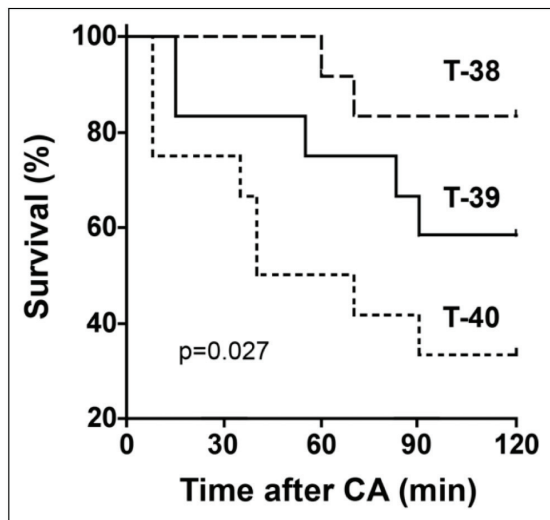


Figure 2. Survival. Kaplan-Meier survival curves in the different experimental groups submitted to 15 minutes of asphyxial cardiac arrest (CA). Survival was higher when core temperature was lower at the onset of CA (*P* < .05 by log-rank test). T-38, T-39, and T-40 indicate the groups of rabbits with a core temperature at 38°C, 39°C, and 40°C prior to CA, respectively (n = 12/group).

CA in the T 38 group, only 7 (58%) of 12 and 4 (33%) of 12 survived in the T-39 and T-40 groups, respectively (*P* = .027; Figure 2). Pupillary reactivity was absent 120 minutes after CA in all rabbits at the higher temperature (ie, T-40), whereas it was present in 8 (67%) of the 12 rabbits in the T-38 group at the end of the protocol (*P* < .05).

Hemodynamics

As shown in Figure 1, there was no difference in baseline hemodynamics between the CA groups, with the exception of HR, which was significantly lower in the T-38 group (*P* < .05 compared to the T-39 and T-40 groups). Hemodynamics did not change significantly over time in the Sham group (data not shown). The MAP was severely impaired in all groups after CA (*P* < .05 compared to baseline; Figure 1). In the first minute of heart massage, MAP reached 20 ± 2 mm Hg (*P* = ns among groups). When compared to the T-38 group, MAP was

significantly lower 5 minutes after CA in the T-40 group (*P* < .05). A similar trend was observed during the rest of the follow-up. A significant decrease in EtCO₂ after CA was observed in the T-40 group (Figure 1).

Biochemical Markers of Cardiac and Brain Damage

The T-40 group displayed a significant (*P* < .05) increase in troponin Ic (43 ± 12 µg/L) when compared to the T-38 group (13 ± 3 µg/L) and Sham (1 ± 1 µg/L; n = 4-6/group). Blood level of protein S100B was significantly (*P* < .05) higher in the T-40 group (1201 ± 155 pg/L) than in the T-38 group and Sham groups (483 ± 15 and 263 ± 22 pg/L, respectively; n = 4-6/group).

Mitochondrial Functions

As depicted in Figure 3, the amount of Ca²⁺ required to open the mPTP of mitochondria isolated from both brain and heart (ie, the CRC) was significantly decreased after resuscitated CA in all groups when compared to the Shams (*P* < .05). In addition, the susceptibility to mPTP opening was significantly increased in brain mitochondria from the T-40 group when compared to the T-38 group (*P* < .05; Figure 3). A similar trend was observed in the heart (*P* = not significant; Figure 3). As shown in Table 2, ADP-stimulated respiration was significantly decreased after CA in both brain and heart mitochondria from the T-39 and the T-40 group when compared to the Shams (*P* < .05). These anomalies were all the more significant in brain mitochondria from the T-40 group (Table 2).

Discussion

This study demonstrates that small changes in body temperature prior to CA (ie, close to physiological values) significantly alter brain mitochondrial functions and short-term outcomes in rabbits. Most deaths that occur after successfully resuscitated CA are linked to the post-CA syndrome that encompasses cardiovascular failure and anoxic-ischemic brain damage.³² In the present study, we showed that minor changes in body temperature (as small as 1°C-2°C) prior to CA have a significant impact on hemodynamics, survival, heart damage, and neurological outcomes. Our results are in agreement with previous studies demonstrating that variations in the same magnitude in per ischemic temperatures critically determine the extent of I/R injury in brain, heart, kidney, and liver.^{14-20,33,34} It has been shown experimentally that changes in temperature during coronary occlusion, within a physiologic range, strongly affect myocardial infarct size and, consequently, the risk of heart failure.¹⁷⁻¹⁹ Using stroke models, it has also been previously reported that small perischemic changes in temperature strongly alter neurological outcomes.^{14-16,35} For example, Wass et al showed that the neurological function score was subnormal when core temperature was decreased by only 1°C during transient global cerebral ischemia, whereas a 1°C increase leads to irreversible neurologic deficits.¹⁶ To date, it has only

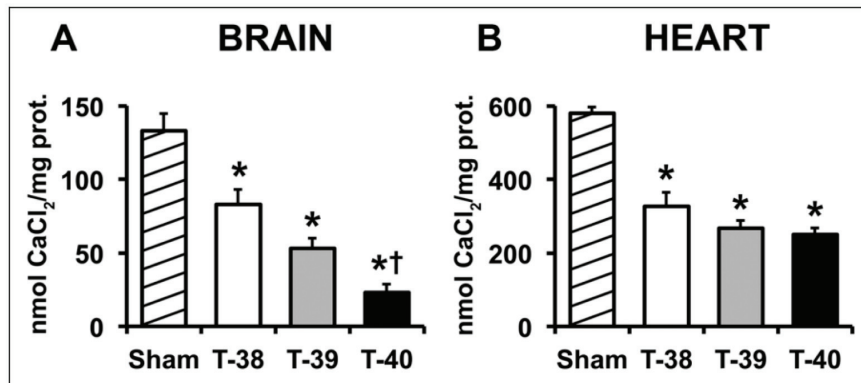


Figure 3. Calcium retention capacity. Panel A: calcium retention capacity (CRC), an indicator of mitochondrial permeability transition, was significantly reduced in brain mitochondria isolated from all CA groups (T-38, T-39, and T-40 indicate the groups of rabbits with a core temperature at 38°C, 39°C, and 40°C prior to CA, respectively; n = 4-7/group). The higher the core temperature prior to cardiac arrest, the lower the CRC in brain mitochondria. Panel B: CRC was also significantly decreased in mitochondria isolated from hearts after resuscitated CA but no significant difference was observed between CA groups (n = 4-7/group). *P < .05 versus Sham; †P < .05 versus T-38 group. CA indicates cardiac arrest.

Table 2. Oxidative Phosphorylation.^a

	State 3	State 4	RCI
Heart			
Sham	93 ± 10	13 ± 2	6.8 ± 0.3
T-38	65 ± 8	9 ± 2	7.0 ± 1.0
T-39	44 ± 4 ^b	8 ± 1	5.9 ± 0.5
T-40	57 ± 6 ^b	11 ± 3	5.3 ± 1.0
Brain			
Sham	42 ± 2	5 ± 1	8.3 ± 0.6
T-38	27 ± 1 ^b	5 ± 1	6.6 ± 1.2
T-39	21 ± 3 ^b	5 ± 1	4.5 ± 0.7 ^b
T-40	9 ± 2 ^{b,c,d}	4 ± 0	2.2 ± 0.3 ^{b,c}

Abbreviation: RCI, respiratory control index.

^aState 3 and state 4 are expressed as nanograms-atoms of oxygen/min/mg proteins; RCI (state 3/state 4; n = 4-7/group).

^bP < .05 versus Sham group.

^cP < .05 versus T-38 group.

^dP < .05 versus T-39 group.

been shown, in experimental CA that mild therapeutic hypothermia (induced early after resuscitation) improves both hemodynamics and the neurologic status.^{36,37} Our work extends this demonstration of the role of temperature to the period before CA. Indeed, we have found that perischemic temperature influences a clinically relevant brain stem reflex (ie, pupillary reactivity), the degree of neuronal lysis as assessed by protein S-100B, as well as the severity of the postresuscitation cardiovascular failure. Our experimental results are also consistent with clinical studies. Zeiner et al reported that an increase in temperature by only 1°C following CA doubled the risk of an unfavorable neurologic recovery in humans.⁷ In the same way, Nielsen et al recently demonstrated that lowering the body temperature by 1°C after out-of-hospital CA was as effective as aiming for a temperature of 32°C to 34°C to improve neurological outcomes.³⁸

Numerous theories have been postulated to explain the effect of temperature changes on I/R injury.^{22,23} It is presumed that the beneficial effects of lowering the per-ischemic temperature are mostly due to a slowing of cell metabolism.^{22,23} The reverse is true for hyperthermia. However, our current understanding is that the alteration in metabolic rate is only one of the many mechanisms underlying the effects of temperature. Thus, temperature may modulate cell signalling pathways (eg, survival kinases), excitotoxicity, blood-brain barrier permeability, inflammation, oxidative stress, and ionic fluxes, among others.^{22,23,39} Regarding these last 2 mechanisms, reactive oxygen generation and mitochondrial calcium load are of particular interest because they are major regulators of mPTP opening.^{40,41} Under normal conditions, the mitochondrial inner membrane is impermeable to almost all metabolites and ions, and the mPTP is in a closed conformation. Under some stress conditions, such as global I/R, the combination of a burst of radical oxygen species and a calcium overload may open mPTP. This results in the collapse of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), uncoupling of the respiratory chain, matrix swelling, and efflux of calcium and proapoptotic factors, which may lead to cellular dysfunctions and/or cell death.^{38,39} Involvement of the mPTP in the pathophysiology of post-CA syndrome is supported by evidence that pharmacological mPTP inhibition at the time of resuscitation prevents both cardiovascular failure and brain damage.^{10,12,13} The present study confirms that resuscitated CA increases susceptibility to mPTP opening and impairs mitochondrial respiration. Although we observed a clear decrease in both CRC and RCI in brain mitochondria when the temperature rose, we did not observe any significant difference in mPTP opening and mitochondrial respiration in the heart. We can therefore speculate that brain mitochondria are more susceptible to small changes in temperature. Another feasible explanation is that the rabbits with the most severely injured heart mitochondria did not survive

to the end of the experimental protocol. To the best of our knowledge, such in vivo effects on brain mitochondrial functions from small changes in perischemic temperature have not been previously reported. Until now, similar alterations in mitochondrial functions have only been observed in 1 study where temperature manipulation (ie, hypothermia) was applied after CA.¹¹ In summary, it is reasonable to assume that small changes in temperature, including during the pre-CA period, may influence the severity of the post-CA syndrome by affecting mitochondrial functions.

The majority of patients who receive CPR do not survive to leave hospital.^{1,3-5} Consequently, identification of factors influencing resuscitation and outcomes, especially if they are modifiable, is still crucial for the improved management of CA. Several preexisting conditions, which significantly influence outcomes, such as age, sex, and underlying disease, have been identified.^{1,3-5} Unfortunately, most of them are not modifiable. Here, we report a new experimental finding that core temperature prior to CA (an easily modifiable factor) strongly influences outcomes. In clinical practice, this question is of importance since slight alterations in core temperature, as well as unexpected CA, are both common occurrences in hospitalized patients.^{2-5,42} Previous clinical studies have also reported that underlying conditions, known to be associated with fever, such as sepsis, stroke, or malignancies, are predictive of bad outcomes when present before CA.^{4,5} Unfortunately, the potential independent role of temperature was not evaluated in these studies. In the present work, we chose an asphyxia-induced nonshockable CA model to test our hypothesis because asystole, frequently precipitated by hypoxia, is the first monitored arrhythmia in a majority of in-hospital CA.³⁻⁵ It seems likely that our experimental data can be transferred to humans. If this is the case, the knowledge of the core temperature prior to an in-hospital CA might be useful to predict the outcomes in this setting. Moreover, it would encourage the better control of core temperature in patients at high risk of CA.

Conclusion

In summary, the present study provides evidence that small change in body temperature at the onset of CA results in a profound effect on mitochondrial functions and short-term outcomes in rabbits. Clinical studies are now needed to test whether our results can be translated to humans.

Author Contributions

M. Cour contributed to conception or design, contributed to acquisition, drafted the article, gave final approval, and agrees to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy. V. Jahandiez and J. Loufouat, contributed to acquisition, critically revised the article, gave final approval, and agrees to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy. M. Ovize contributed to conception or design, critically revised the article, gave final approval, and agrees to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy. L. Argaud contributed to conception or design, contributed to acquisition, analysis, or interpretation,

drafted the article, gave final approval, and agrees to be accountable for all aspects of work ensuring integrity and accuracy.

Authors' Note

This work was done at INSERM UMR 1060, CarMeN, Lyon, France.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

References

1. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics 2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2014;129(3):e28-e292.
2. Sandroni C, Nolan J, Cavallaro F, Antonelli M. In-hospital cardiac arrest: incidence, prognosis and possible measures to improve survival. *Intensive Care Med*. 2007;33(2):237-245.
3. Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, et al. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. *JAMA*. 2006;295(1):50-57.
4. Chan PS, Berg RA, Spertus JA, et al. Risk-standardizing survival for in-hospital cardiac arrest to facilitate hospital comparisons. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(7):601-609.
5. Tian J, Kaufman DA, Zarich S, et al. Outcomes of critically ill patients who received cardiopulmonary resuscitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182(4):501-506.
6. Eisenberg MS, Hallstrom A, Bergner L. The ACLS score: predicting survival from out-of-hospital cardiac arrest. *JAMA*. 1981;246(1):50-52.
7. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, et al. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med*. 2001;161(16):2007-2012.
8. Gebhardt K, Guyette FX, Doshi AA, Callaway CW, Rittenberger JC; Post Cardiac Arrest Service. Prevalence and effect of fever on outcome following resuscitation from cardiac arrest. *Resuscitation*. 2013;84(8):1062-1067.
9. Ayoub IM, Radhakrishnan J, Gazmuri RJ. Targeting mitochondria for resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2008;36(11 suppl):440-446.
10. 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(2):226-235.
11. Gong P, Hua R, Zhang Y, et al. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33(6):928-934.
12. Huang CH, Tsai M-S, 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):41-47.
13. Cour M, Abrial M, Jahandiez V, et al. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced

- multiple organ failure. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(8):930-936. doi:10.1152/jappphysiol.00495.2014.
14. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraschemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1987;7(6):729-738.
 15. Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Loor Y. Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke*. 1990;21(9):1318-1325.
 16. Wass CTC, Lanier WLW, Hofer RE, Scheithauer BW, Andrews AG. Temperature changes of $>$ or $=$ 1 degree C alter functional neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 1995;83(2):325-335.
 17. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res*. 1994;28(7):1014-1017.
 18. Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol*. 1996;270(4 pt 2):H1189-H1199.
 19. Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1997;273(1 pt 2):H220-H227.
 20. Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, et al. Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2009;83(2):345-353.
 21. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improve outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation*. 2004;109(22):2786-2791.
 22. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med*. 2009;37(7 suppl):186-202.
 23. Delhaye C, Mahmoudi M, Waksman R. Hypothermia therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(3):197-210.
 24. Heroux O. Metabolic adjustments to low temperatures in New Zealand White rabbits. *Can J Physiol Pharmacol*. 1967;45(3):451-461.
 25. Gudipati CV, Weil MH, Bisera J, Deshmukh HG, Rackow EC. Expired carbon dioxide: a noninvasive monitor of cardiopulmonary resuscitation. *Circulation*. 1988;77(1):234-239.
 26. Zhao D, Weil MH, Tang W, Klouche K, Wann R. Pupil diameter and light reaction during cardiac arrest and resuscitation. *Crit Care Med*. 2001;29(4):825-828.
 27. Leger PL, De Paulis D, Branco S, et al. Evaluation of cyclosporine A in a stroke model in the immature rat brain. *Exp Neurol*. 2011;230(1):58-66.
 28. Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-Nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res*. 2010;88(3):630-639.
 29. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005;111(2):194-197.
 30. Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, et al. Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in post-conditioned (but not preconditioned) hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008;294(1):H386-H391.
 31. Wei X, Duan L, Bai L, Tian M, Li W, Zhang B. Effects of exogenous hydrogen sulfide on brain metabolism and early neurological function in rabbits after cardiac arrest. *Intensive Care Med*. 2012;38(11):1877-1885.
 32. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, et al. Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. *Circulation*. 2008;118(23):2452-2483.
 33. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, Nahas El AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2007;39(10):2983-2985.
 34. Heijnen BH, van Veen SQ, Straatsburg IH, van Gulik TM. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *J Appl Physiol*. 2001;91(1):265-268.
 35. Rytter A, Cardoso CMP, Johansson P, et al. The temperature dependence and involvement of mitochondria permeability transition and caspase activation in damage to organotypic hippocampal slices following in vitro ischemia. *J Neurochem*. 2005;95(4):1100-1117.
 36. Logue ES, McMichael MJ, Callaway CW. Comparison of the effects of hypothermia at 33 degrees C or 35 degrees C after cardiac arrest in rats. *Acad Emerg Med*. 2012;14(4):293-300.
 37. 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(1):123-129.
 38. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. Targeted temperature management 33°C versus 36°C after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2013;369(23):2197-2206.
 39. Yang X, Liu Y, Yang XM, et al. Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol*. 2011;106(3):421-430.
 40. Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L. Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2011;16(2):117-130.
 41. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1047:248-258.
 42. Peres-Bota D, Lopes Ferreira F, Mélot C, Vincent JL. Body temperature alterations in the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004;30(5):811-816.

Synthèse des résultats et discussion

Ce travail montre, dans notre modèle animal, que la température corporelle au moment de l'AC influence la sévérité du syndrome post-AC. Ces résultats sont concordants avec les données de la littérature sur l'influence de la température per-ischémie dans des ischémies focales.^{345,346,456-461} Notre étude permet d'étendre la démonstration sur l'influence de la température avant l'épisode ischémique, ceci dans le contexte particulier d'I/R qu'est l'AC. Nos résultats suggèrent que la mitochondrie et son PTP sont impliqués dans les mécanismes physiopathologiques. La question de l'influence de la température avant l'AC est pertinente en pratique clinique puisque les patients hospitalisés sont une population à risque de survenue de fièvre et d'AC.⁴⁶²⁻⁴⁶⁶ Ainsi, la température au moment de l'AC intra-hospitalier serait susceptible de faire partie des facteurs prédictifs du pronostic des patients.

Etude n°2

Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition

Vincent Jahandiez, Martin Cour, Thomas Bochaton, Maryline Abrial, Joseph Loufouat, Abdallah Gharib, Annie Varennes, Michel Ovize, Laurent Argaud

Publiée dans *Basic Research in Cardiology*



ORIGINAL CONTRIBUTION

Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition

Vincent Jahandiez^{1,2,3} · Martin Cour^{1,2,3} · Thomas Bochaton³ · Maryline Abrial³ · Joseph Loufouat³ · Abdallah Gharib³ · Annie Varennes⁴ · Michel Ovize³ · Laurent Argaud^{1,2,3}

Received: 14 March 2017 / Accepted: 2 May 2017 / Published online: 10 May 2017
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract The opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP), which is regulated by the matrix protein cyclophilin D (CypD), plays a key role in the pathophysiology of post-cardiac arrest (CA) syndrome. We hypothesized that therapeutic hypothermia could prevent post-CA syndrome through a CypD-mediated PTP inhibition in both heart and brain. In addition, we investigated whether specific pharmacological PTP inhibition would confer additive protection to cooling. Adult male New Zealand White rabbits underwent 15 min of CA followed by 120 min of reperfusion. Five groups ($n = 10\text{--}15/\text{group}$) were studied: control group (CA only), hypothermia group (HT, hypothermia at 32–34 °C induced by external cooling at reperfusion), NIM group (injection at reperfusion of 2.5 mg/kg NIM811, a specific CypD inhibitor), HT + NIM, and sham group. The following measurements were taken: hemodynamics, echocardiography, and cellular damage markers (including S100 β protein and troponin I α). Oxidative phosphorylation and PTP opening were assessed on mitochondria isolated from both brain and heart. Acetylation of CypD was measured by immunoprecipitation in both the cerebral cortex and myocardium.

Hypothermia and NIM811 significantly prevented cardiovascular dysfunction, pupillary areflexia, and early tissue damage. Hypothermia and NIM811 preserved oxidative phosphorylation, limited PTP opening in both brain and heart mitochondria and prevented increase in CypD acetylation in brain. There were no additive beneficial effects in the combination of NIM811 and therapeutic hypothermia. In conclusion, therapeutic hypothermia limited post-CA syndrome by preventing mitochondrial permeability transition mainly through a CypD-dependent mechanism.

Keywords Cardiac arrest · Cardiopulmonary resuscitation · Therapeutic hypothermia · Mitochondria · Mitochondrial permeability transition pore

Introduction

Resuscitated cardiac arrest (CA) leads to a complex cascade of pathophysiological processes, which induces brain damage, myocardial dysfunction, and systemic ischemia–reperfusion (I/R) response, all of which are commonly grouped under the term “post-CA syndrome” [24].

Even if there is no doubt that limiting the duration of CA prevents irreversible cell injury, it has also been proposed that resuscitation, by itself, may damage the previously ischemic tissues [24, 26]. Indeed, under the stress conditions occurring at reflow (e.g., oxidative stress and calcium overload), the matrix protein cyclophilin D (CypD) binds to a mega channel located in the inner mitochondrial membrane called the permeability transition pore (PTP) [2, 7]. This interaction promotes the opening of the PTP, which leads to matrix swelling, uncoupling of oxidative phosphorylation, and the release

✉ Laurent Argaud
laurent.argaud@chu-lyon.fr

¹ Hospices Civils de Lyon, Hôpital Edouard Herriot, Service de Réanimation Médicale, 5 Place d’Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France

² Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Faculté de médecine Lyon-Est, 69373 Lyon, France

³ INSERM UMR 1060, CarMeN, Equipe 5 “Cardioprotection”, 69373 Lyon, France

⁴ Hospices Civils de Lyon, Groupement Hospitalier Edouard Herriot, Laboratoire de Biochimie, 69437 Lyon, France

of pro-apoptotic factors, thus compromising cell function and viability [2, 7]. In vivo, pharmacological agents that inhibit the opening of the PTP by blocking CypD (e.g., cyclosporine A, CsA, or its derivatives) limit the severity of the post-CA syndrome, providing direct evidence of the key role of permeability transition in CA-induced reperfusion injury [11, 15, 20].

Mild therapeutic hypothermia is currently the sole adjuvant therapy to cardiopulmonary resuscitation (CPR) that is able to improve survival and neurologic outcomes in humans CA [6]. Experimentally, hypothermia is probably the most powerful intervention for limiting I/R injury, even after CA [1, 29, 33, 34]. Despite intensive basic research, the molecular mechanisms underlying hypothermia's protective effects remain unclear, although a slowing of cell metabolism and the attenuation of the systemic I/R response may be involved [29, 33, 34]. Therapeutic hypothermia may also alleviate bursts of reactive oxygen species and calcium overload, and activate the cell survival signaling pathways [19, 28, 32, 34, 35]. Interestingly, all these factors are thought to be involved in PTP regulation [2, 7, 8]. Moreover, there are some reports suggesting that therapeutic hypothermia limits CA-induced mitochondrial dysfunction, including PTP opening [19, 22, 26]. The combination of therapeutic hypothermia and pharmacological PTP inhibition may offer an attractive opportunity to further prevent mitochondrial damage after CA and thus to reduce the severity of whole body I/R injury. Recent experimental data from a single study support this assumption suggesting that the combined therapy better preserves brain mitochondrial function after CA, even though the benefits in terms of neurological improvement were not assessed [22].

Therefore, in the present study, we investigated the potential synergistic or additive effect of therapeutic hypothermia and specific pharmacological PTP inhibition to prevent the post-CA syndrome. In addition, we examined whether therapeutic hypothermia would confer protection by inhibiting CypD-dependent PTP opening in both the heart and the brain.

Methods

The investigation conformed to French laws and the revised Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, DC, 1996). All experiments were approved by the Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research.

Cardiac arrest model

We used our well-validated rabbit CA model [11, 14, 15]. In brief, adult male New Zealand White rabbits were anesthetized by intramuscular injection of xylazine and ketamine. Animals were shaved to facilitate external temperature control. A tracheotomy was performed and animals underwent mechanical ventilation. Invasive mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and central body temperature were continuously recorded. Core temperature was measured using a thermistor inserted into the esophagus and was maintained within a physiological range using heating pads. Room temperature was kept constant at 25 °C. End-tidal carbon dioxide concentration and pulse oxymetry were also monitored. A 15-min stabilization period was observed before experiments. Rabbits were then paralyzed with an intravenous (IV) injection of pancuronium bromide. Primary asphyxial CA was induced by the withdrawal of mechanical ventilation. After 15 min of untreated CA, resuscitation was started with the resumption of mechanical ventilation, cardiac massage, and IV administration of epinephrine (20 µg/kg). Restoration of spontaneous circulation (ROSC) was defined as the return of an organized cardiac rhythm for at least 3 min, with MAP and HR above 20 mmHg and 100 bpm, respectively. In the absence of ROSC after 15 min, the animal was declared dead.

Experimental protocol

Animals were randomly assigned (Fig. 1a) into sham-operated animals (SHAM), controls (CTRL, CA with 120 min of reperfusion), or three treated groups: HT (hypothermia-treated group), NIM (IV bolus, at the onset of reperfusion, of 2.5 mg/kg NIM811, i.e. *N*-methyl-4-isoleucine-cyclosporine, a non-immunosuppressive derivative of CsA [4, 31]), and HT + NIM. Hypothermia was obtained by external cooling at the onset of resuscitation with ice packs covering the body. The targeted core temperature (32–34 °C) was reached in less than 20 min and maintained for 60 min (Fig. 1b). Animals were then passively rewarmed (removing of ice packs) until the end of the experiment. The choice of this protocol of therapeutic hypothermia was made on the basis of studies showing that short duration of mild hypothermia-induced rapidly and early after experimental cardiac arrest was at least as protective than longer duration of cooling [1, 33].

Markers of organ injury and/or failure

Left ventricle (LV) surface shortening fraction (SSF) was measured at baseline and after 120 min of reperfusion by echocardiography with a 7-MHz linear transducer (Vivid 7,

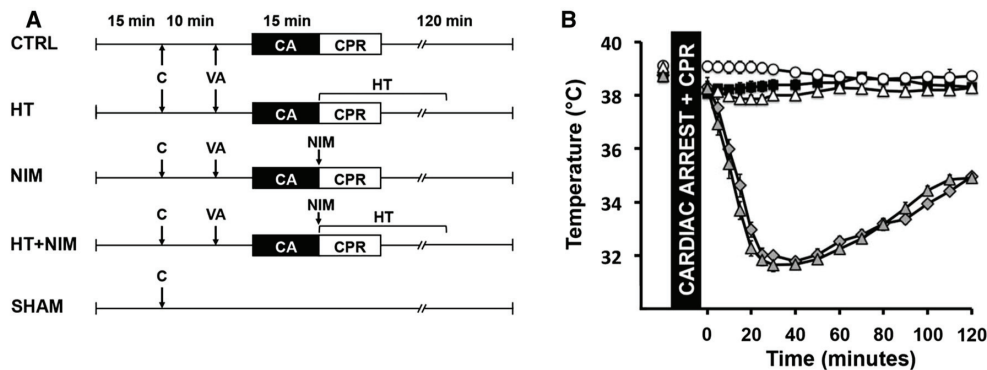


Fig. 1 Experimental design. **a** Controls (CTRL), Hypothermia 32–34 °C (HT) or NIM811- (NIM), and hypothermia + NIM811-treated rabbits (HT + NIM) underwent 15 min of primary asphyxial cardiac arrest (CA). CA was induced by ventilatory arrest (VA) under curarization (C) followed by cardiopulmonary resuscitation (CPR)

and 120 min of reperfusion. **b** Core temperature was monitored before CA and throughout the experiment in CTRL (black square), HT (gray diamond), NIM (white triangle), HT + NIM (gray triangle), and SHAM (white circle)

GE Medical Systems, Milwaukee, WI, USA). Blood samples were collected after 120 min of reperfusion to assess blood gases, HCO_3^- , troponin I α , arterial lactate, alanine aminotransferase (ALT), and creatinine levels ($n = 8\text{--}10/\text{group}$). Samples were analyzed at an off-site reference laboratory blinded to the clinical data. The ratio of the arterial partial pressure of oxygen (PaO₂) to the fraction of inspired oxygen (FiO₂), a widely used index of oxygen exchange, was calculated. Pupillary reactivity to light, a rough estimate of cerebral damage after CA, was defined as present when pupils constricted more than 1 mm. Plasma levels of S100 β protein, a sensitive marker of neuronal injury, were determined using an ELISA kit (Abnova[®]) [14].

Mitochondrial assays

As previously described, mitochondria from the left side of the cerebral cortex and the LV anterior wall of the heart were isolated by differential centrifugation [5, 11, 14, 15, 21]. The persons performing the procedures were blinded to the animals' group assignment. Mitochondrial respiratory function was measured ($n = 6\text{--}9/\text{group}$) using the polarographic method [3, 11, 14, 15]. State 3 (ADP-stimulated), State 4 (ADP-limited), and respiratory control index (RCI: State 3/State 4) were determined by oxygraphy (Oroboros Oxygraph 2-K, Oroboros Instrument Corp, Innsbruck, Austria). Calcium retention capacity (CRC) was also assessed ($n = 8\text{--}9/\text{group}$), as previously described [3, 5, 11, 15]. The amount of CaCl₂ necessary to trigger a massive Ca²⁺ release (CRC) was used as an indicator of the susceptibility of PTP opening to a Ca²⁺ overload. CRC was expressed as

nmoles of CaCl₂ per milligram of proteins. As previously reported, isolated mitochondria were also exposed to 1- μM CsA before calcium challenge to further explore in vitro CypD-dependant PTP opening [11, 15]. Electron donors to complex I (5-mM glutamate and 5-mM malate) were used for both CRC and mitochondrial respiration assays. As described elsewhere [8], acetylation of CypD was determined by immunoprecipitation followed by western blot analysis ($n = 4\text{--}5/\text{group}$). Proteins were extracted from snap frozen cerebral cortex and myocardium using an Active Motif[®] kit and immunoprecipitated (magnetic beads bound to IgG) with antibody directed against acetylated lysine proteins (Cell Signaling Technology[®]). Primary antibodies used for western blot analyses were anti-CypD antibody (Calbiochem[®]) and anti-VDAC (Abcam[®]). Acetylated CypD was quantified by normalization with IgG.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM or number (%). Results were analyzed with the Graphpad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparisons of categorical variables were performed using two-sided Chi-square test. Normality of continuous data was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test. Continuous data were compared using one-way ANOVA or by the Kruskal–Wallis test, as appropriate. Comparisons between time-based measurements within each group were performed with two-way ANOVA with repeated measures on one factor. Statistical significance was defined as a value of $p < 0.05$.

Results

A total of 59 rabbits were used in this study. Two animals were excluded before randomization because of asphyxia prior to mechanical ventilation for one and hemorrhagic shock for the other. Results from the remaining 57 rabbits are presented (SHAM: $n = 10$; CTRL: $n = 15$; HT: $n = 11$; NIM: $n = 11$; HT + NIM: $n = 10$).

Cardiac arrest, resuscitation, and outcomes

As expected, asphyxia time before CA and the duration of the heart massage did not differ between groups (data not shown). Doses of epinephrine were significantly lower ($p < 0.001$) in the HT ($21 \pm 1 \mu\text{g/kg}$), NIM ($20 \pm 0 \mu\text{g/kg}$), and HT + NIM ($21 \pm 1 \mu\text{g/kg}$) groups compared to the controls ($32 \pm 2 \mu\text{g/kg}$). Although 5 (33%) rabbits died after CA in the control animals, only one animal (9–10%) died in each treatment group ($p = 0.09$ vs. CTRL group).

Hemodynamics

As reported in Table 1, hemodynamics did not significantly differ between the groups at baseline ($p = \text{ns}$). As expected, HR significantly decreased after resuscitated CA in animals treated with hypothermia compared with normothermic groups (Table 1). MAP was severely impaired in all groups after CA ($p < 0.05$ vs. baseline). When compared with controls, treatment groups exhibited a significantly higher MAP at the end of the experiment (Table 1).

Table 1 Hemodynamics

	Baseline	30 min	60 min	120 min
HR (beats/min)				
SHAM	172 ± 5	174 ± 9	173 ± 10	175 ± 7
CTRL	168 ± 4	203 ± 7 ^{*,†}	207 ± 12	186 ± 6
HT	164 ± 5	111 ± 8 ^{*,†,‡}	108 ± 6 ^{*,†,‡}	124 ± 2 ^{*,†,‡}
NIM	175 ± 9	183 ± 11	175 ± 9 [‡]	178 ± 7
HT + NIM	172 ± 6	101 ± 7 ^{*,†,‡}	103 ± 8 ^{*,†,‡}	132 ± 5 ^{*,†,‡}
MAP (mmHg)				
SHAM	69 ± 4	61 ± 4	61 ± 4	69 ± 3
CTRL	71 ± 3	34 ± 3 ^{*,†}	37 ± 5 ^{*,†}	31 ± 3 ^{*,†}
HT	75 ± 3	44 ± 3 ^{*,†}	51 ± 2 ^{*,‡}	50 ± 1 ^{*,†,‡}
NIM	67 ± 3	44 ± 3 ^{*,†}	51 ± 2 ^{*,‡}	50 ± 2 ^{*,†,‡}
HT + NIM	66 ± 1	38 ± 1 ^{*,†}	46 ± 3 ^{*,†}	51 ± 4 ^{*,†,‡}

HR heart rate, MAP mean arterial pressure, CTRL controls, HT hypothermia, NIM NIM811

* $p < 0.05$ vs. baseline; † $p < 0.05$ vs. SHAM; ‡ $p < 0.05$ vs. CTRL

Cerebral and myocardial injury

Markers of brain and cardiac injury are presented in Fig. 2. In the control group, CA resulted in pupillary areflexia in 11/15 (73%) animals and in a significant increase in S100β protein ($p < 0.001$ vs. sham animals). Both hypothermia and NIM811 prevented neuronal damage ($p < 0.05$ vs. controls). Control rabbits also exhibited a significant increase in troponin Ic at the end of reperfusion, averaging $14.3 \pm 1.4 \mu\text{g/l}$ compared with sham animals ($0.3 \pm 0.1 \text{ ng/ml}$, $p < 0.001$). Hypothermia and NIM811 significantly prevented this troponin Ic release (Fig. 2). With regards to the echocardiographic data, LV systolic function did not differ between groups at baseline (data not shown). Resuscitated CA resulted in a significant SSF impairment in the CTRL group compared to the sham animals (Fig. 2): 16 ± 3 vs. $49 \pm 2\%$, respectively ($p < 0.001$). Both hypothermia and NIM811 significantly improved SSF ($p < 0.001$ vs. CTRL group).

Multiple organ dysfunctions

As presented in Table 2, resuscitated CA led to a significant increase in serum lactate, ALT, and creatinine compared to the sham animals ($p < 0.0001$). Hypothermia and NIM811 prevented the rise of these cellular injury biomarkers ($p < 0.05$ vs. controls). In the same way, metabolic acidosis was less severe in both the hypothermia groups and the NIM811-treated animals compared to controls ($p < 0.05$). $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ did not differ between the groups.

Mitochondrial function

Mitochondria isolated from the cerebral cortex and myocardium exhibited significant impairment in oxidative phosphorylation (i.e., decrease in state 3) in the controls compared to sham animals ($p < 0.05$) (Table 3). As expected, this phenomenon was prevented by both hypothermia and NIM811 (Table 3).

As depicted in Fig. 3, CRC (from brain and heart) significantly decreased after CA in controls ($p < 0.001$ vs. sham animals). Hypothermia, as well as NIM811, resulted in a significant increase in the amount of Ca^{2+} required to trigger PTP opening compared to controls ($p < 0.05$). In all groups, CRC was significantly enhanced in both cerebral cortex and myocardium by the in vitro addition of $1\text{-}\mu\text{M}$ CsA ($p < 0.05$).

One might question whether the difference of MAP between the hypothermia-treated animals and controls (Table 1) might influence our results. Therefore, in a post hoc analysis, we selected the five rabbits with the lowest MAP from the hypothermia-treated group and matched them with five controls (including two historical animals) based on

Fig. 2 Cerebral and myocardial injury. Cardiac arrest resulted in pupillary areflexia in most of the control animals and a significant increase in the level of serum S100β protein compared to the sham animals. Both hypothermia (HT) and NIM811 (NIM) prevented brain injury compared to the controls (CTRL). Cardiac arrest also led to significant myocardial damage, as determined by the surface shortening fraction (SSF) and troponin Ic release, both prevented by hypothermia and NIM811. **p* < 0.01 vs. SHAM; †*p* < 0.05 vs. CTRL

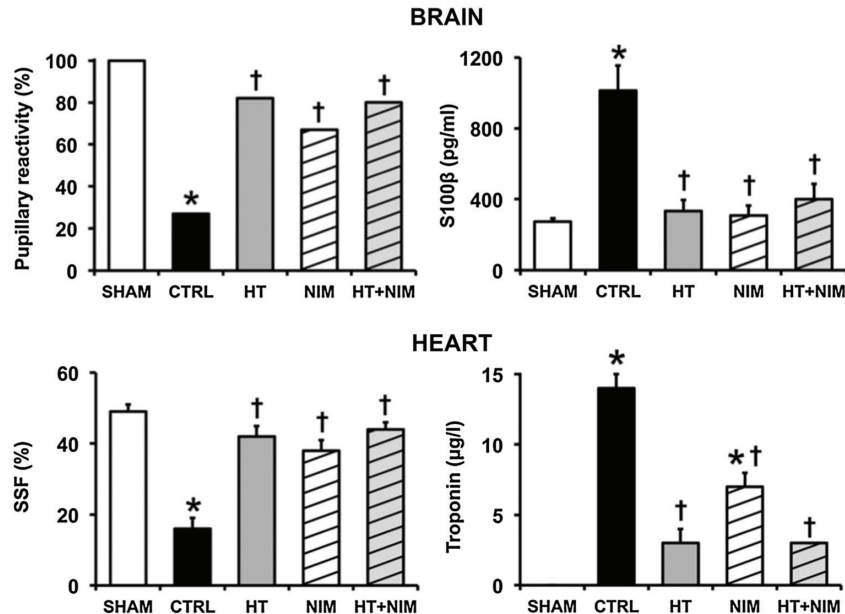


Table 2 Markers of metabolic disorders, cellular injury, and organ dysfunctions

	pH	PaCO ₂ (mmHg)	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	Lactate (mmol/l)	ALT (IU/l)	Creatinine (µmol/l)
SHAM	7.42 ± 0.02	45 ± 4	568 ± 21	30 ± 2	3 ± 1	42 ± 7	76 ± 3
CTRL	7.04 ± 0.07*	39 ± 6	502 ± 40	10 ± 1*	17 ± 3*	128 ± 20*	146 ± 4*
HT	7.23 ± 0.03*†	39 ± 3	532 ± 13	14 ± 1*	11 ± 1*†	66 ± 11†	108 ± 5*†
NIM	7.30 ± 0.04†	43 ± 2	507 ± 12	18 ± 2*†	8 ± 1†	54 ± 7†	111 ± 8*†
HT + NIM	7.26 ± 0.01*†	40 ± 1	484 ± 33	15 ± 1*	10 ± 1†	51 ± 6†	101 ± 6*†

PaCO₂ partial pressure of arterial carbon dioxide, PaO₂/FiO₂ ratio of the partial pressure of arterial oxygen to the fraction of inspired oxygen, ALT alanine aminotransferase, CTRL controls, HT hypothermia, NIM NIM811

* *p* < 0.05 vs. SHAM; † *p* < 0.05 vs. CTRL

MAP. The differences in terms of oxidative phosphorylation and CRC were still observed when mitochondrial functions were compared in these subsets of animals with similar hemodynamics at reperfusion (Table 4).

After 2 h of reperfusion, acetylation of CypD in the cerebral cortex was significantly higher (*p* < 0.01) in the controls than in the sham animals and treated rabbits (Fig. 3). In contrast, no difference was observed in myocardium between the groups.

Discussion

The present study shows that fast induction of therapeutic hypothermia at the onset of CPR and specific pharmacological PTP inhibition prevent to a similar extent CA-induced mitochondrial dysfunction and attenuate the severity

of post-CA syndrome. The combination of these two treatments did not enhance protection, suggesting that therapeutic hypothermia mitigate I/R injury following resuscitated CA by inhibiting the CypD-dependent mitochondrial permeability transition. We also reported here, for the first time, that hypothermia might provide neuroprotection by modulating CypD acetylation.

Brain damage and cardiovascular failure, resulting from global I/R injury after resuscitated CA, are the two main components of post-CA syndrome [24]. To date, in contrast to the controversial effect of hypothermia on myocardial infarct size reduction in patients [18], therapeutic hypothermia is the only post-resuscitation therapy shown to attenuate the severity of post-CA syndrome in both experimental and clinical conditions [1, 6, 10, 24, 29, 33]. The present study provides additional evidence of the powerful neuroprotective effect of therapeutic hypothermia following

Table 3 Oxidative phosphorylation

	State 3	State 4	RCI
Brain			
SHAM	38 ± 2	6 ± 1	7 ± 1
CTRL	17 ± 3*	5 ± 1	4 ± 1
HT	29 ± 2 [†]	3 ± 0	8 ± 1 [†]
NIM	36 ± 2 [†]	5 ± 0	8 ± 1 [†]
HT + NIM	33 ± 2 [†]	4 ± 1	8 ± 0 [†]
Heart			
SHAM	88 ± 10	13 ± 2	7 ± 0
CTRL	48 ± 5*	9 ± 2	6 ± 1
HT	69 ± 10 [†]	9 ± 1	8 ± 1 [†]
NIM	77 ± 8 [†]	9 ± 1	8 ± 1 [†]
HT + NIM	87 ± 9 [†]	9 ± 1	9 ± 0* [†]

State 3 and State 4 are expressed in nanogram atoms of oxygen/min/mg proteins

RCI respiratory control index (State 3/State 4), CTRL controls, HT hypothermia, NIM NIM811

* $p < 0.05$ vs. SHAM; [†] $p < 0.05$ vs. CTRL

CA. In our model, this intervention prevented pupillary areflexia, a major clinical sign that consistently predicts irreversible brainstem injury [9, 11, 14, 15]. Therapeutic hypothermia also lowered plasma levels of S100β protein, a sensitive marker of neuronal damage routinely used in clinical practice to determine the extent of brain injury [9]. Although a large clinical trial did not support the superiority of mild (33 °C) or slight (36 °C) therapeutic hypothermia [25], we chose to cool the animals to 32–34 °C, which is the most frequently chosen core temperature range for neuroprotection in both clinical and experimental research [1, 6, 10, 33]. Fast therapeutic hypothermia also limited myocardial damage in the present study, as indicated by a decrease in troponin Ic levels and preservation of LV systolic function. Our results are in line with the previous experimental studies which show that fast cooling preserved cardiovascular function when applied within the first minutes of CPR [10, 19, 30]. However, as the duration of observation was limited in our model, we cannot rule out that therapeutic hypothermia only delayed irreversible tissue damage. Interestingly, most reports have indicated that delaying

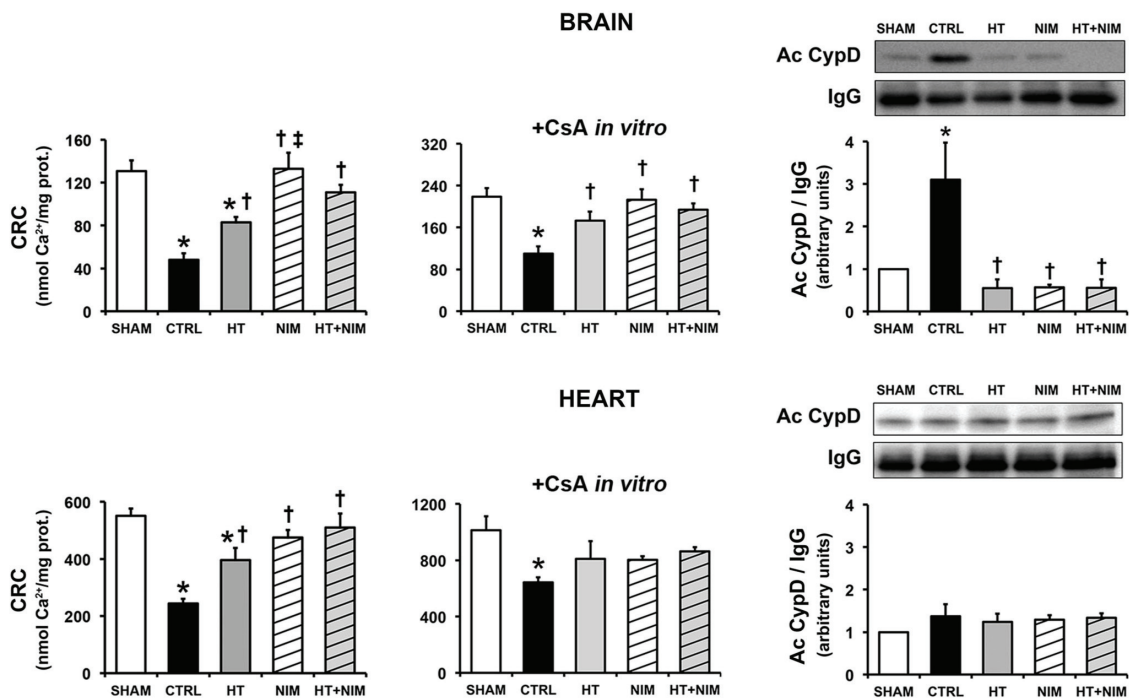


Fig. 3 Cyclophilin D-dependant mitochondrial permeability transition. Calcium retention capacity (CRC) significantly decreased after cardiac arrest in mitochondria isolated from the brain and the heart of controls (CTRL). Hypothermia (HT), as well as NIM811 (NIM), caused a significant decrease in PTP opening susceptibility (i.e., a CRC increase) without additive effects. In vitro addition of CsA

before calcium challenge significantly enhanced CRC in all groups but to a lesser extent in mitochondria isolated from controls. In the brain, acetylation of cyclophilin D (Ac CypD) was significantly lower in HT and NIM groups compared to controls animals. * $p < 0.05$ vs. SHAM; [†] $p < 0.05$ vs. CTRL; [‡] $p < 0.05$ vs. HT

Table 4 Endpoints at 120 min of reperfusion in subgroups of controls and hypothermia-treated animals with similar hemodynamics

	CTRL group	HT group	<i>p</i>
MAP (mmHg)	43 ± 2	46 ± 1	0.102
Brain			
State 3	20 ± 4	30 ± 3	0.023
CRC	52 ± 12	88 ± 10	0.026
S100β (pg/ml)	1135 ± 158	536 ± 138	0.011
Heart			
State 3	45 ± 5	83 ± 15	0.031
CRC	284 ± 39	416 ± 59	0.049
SSF (%)	22 ± 4	45 ± 4	0.003

State 3 is expressed in nanogram atoms of oxygen/min/mg proteins; CRC is expressed in nmol Ca²⁺/mg proteins

MAP mean arterial pressure, CRC calcium retention capacity, SSF surface shortening fraction, CTRL controls, HT hypothermia

hypothermia after this timeframe fully abolishes cardioprotection [1, 10, 30]. We chose to test only fast cooling (expected level of hypothermia obtained in less than 20 min) for a short duration (1 h) to target early endogenous mechanisms potentially involved in the pathogenesis of reperfusion injury. Beyond these beneficial effects on the neurological and cardiovascular systems, our results also showed that therapeutic hypothermia might also protect both the kidneys and the liver. In other words, this intervention could limit CA-induced multiple organ failure, a condition that contributes to the poor prognosis of CA [12]. In agreement with the previous studies from our group, the PTP inhibitor NIM811 also limited the severity of the post-CA syndrome [11, 15]. Interestingly, the similar extent of protection observed with NIM811 and hypothermia, without a synergic protective effect, suggests common underlying mechanisms of cellular protection.

Mitochondria are recognized as essential organelles for cell homeostasis. They synthesize ATP through oxidative phosphorylation, regulate cell calcium fluxes, and play a key role in cell death control [13, 23]. Under some stress conditions, such as global I/R, the opening of the PTP in the inner mitochondrial membrane is favored by the combination of bursts of radical oxygen species and calcium overload [2, 7, 13, 23, 26]. PTP opening results in the collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), the uncoupling of the respiratory chain, matrix swelling, and the efflux of calcium and pro-apoptotic factors, thus compromising cell survival [2, 7, 13]. In the present study, we demonstrated in vivo that therapeutic hypothermia lessened CA-induced brain and cardiac mitochondrial damage, even when compared to controls with similar hemodynamics. Indeed, fast cooling significantly decreased susceptibility to PTP opening, prevented a decrease in ADP-stimulated respiration, and improved mitochondrial coupling between oxygen

consumption and phosphorylation. Only a few previous reports have examined the effects of therapeutic hypothermia on mitochondrial functions after CA [14, 16, 19, 22, 28, 32]. Gong et al. first reported, using a swine model of CA, that hypothermia-induced neuroprotection was associated with brain PTP inhibition 24 h after resuscitation [16]. Our results extended this demonstration to an earlier time point after ROSC. Liu et al. have also recently reported that hypothermia may preserve mitochondrial membrane potential (used as a surrogate marker of PTP opening in this study) in brain after CA [22]. Unfortunately, the authors did not provide any data on brain damage to demonstrate potential clinical benefits of this strategy. Moreover, their results may have been biased by the concomitant use of isoflurane for the anesthesia of rats, which is known to have potent mitochondrial effects [36]. Sparse data also suggest that hypothermia has a protective mitochondrial effect against myocardial I/R injury [14, 19, 28, 32]. In the setting of experimental CA, only one study has previously reported a relationship between the cardiovascular benefit of hypothermia and an improvement of mitochondrial functions in the myocardium [19]. It is worth noting that, in this report, the animals were hypothermic before RCP [19]. By showing preservation of both oxidative phosphorylation and mitochondrial membrane integrity, even when hypothermia was induced at the onset of resuscitation, our data strongly suggest a prolonged window for cardioprotection beyond the no-flow period.

The underlying mechanisms, whereby fast cooling prevents brain and heart damage, remain unclear. Besides lowering cellular metabolism, the benefits of hypothermia have been imputed to the alteration of phenomena known to regulate PTP opening: inflammation, ATP depletion, calcium overload, or oxidative stress [16, 27–29, 32, 34, 35]. Several reports also suggest that therapeutic hypothermia might be protective by activating key molecules and signaling pathways (i.e., STAT-3, ERK, and Akt) known to interact with CypD [19, 32, 35]. To investigate the common downstream pathway leading to hypothermia-induced protection, we focused our research on CypD-mediated PTP inhibition. CypD belongs to a family of highly homologous peptidyl-propyl *cis-trans* isomerases, which have been named as “cyclophilins” due to their affinity to the CsA immunosuppressant drug (i.e., the reference PTP inhibitor) [2, 4, 17, 31]. Involvement of CypD in the pathophysiology of post-CA syndrome was supported by the results of previous studies from our group and others demonstrating that pharmacological PTP inhibition by CsA derivatives prevented both brain and cardiac mitochondria dysfunctions [11, 15, 20]. In the present study, we used the specific PTP inhibitor NIM811, devoid of immunosuppressive properties, to investigate the involvement of CypD in the cytoprotective effects of hypothermia [4, 11, 15, 17, 31]. We demonstrated

that fast cooling at resuscitation had similar mitochondrial protective effects as IV administration of NIM811 at the onset of CPR. It is important to note that pharmacological blocking of CypD and hypothermia had no synergic protective effect against resuscitation injury. Therefore, our findings support the hypothesis that hypothermia interacts with CypD to prevent mitochondrial permeability transition. To further explore a more direct implication of CypD, we assessed the acetylation of this matrix mitochondrial protein on lysine 166, a post-translational modification known to favor PTP opening [2, 8]. While we did not detect any significant modification in CypD acetylation in cardiac mitochondria, we found an increase in CypD acetylation in brain mitochondria after CA, which was fully prevented by hypothermia. As we measured CypD acetylation at a single time point, we cannot rule out that this process may occur at different times in the heart and in the brain. Further investigations are needed to address this issue. In any case, modulation of acetylation of CypD might represent a novel molecular mechanism by which hypothermia would provide neuroprotection after CA.

Conclusions

In summary, our experimental data revealed that therapeutic hypothermia starting at the onset of resuscitation or administration of a CsA derivative at the start of reperfusion limited the post-CA syndrome to an equal extent. Both appeared to do so by inhibiting PTP through a CypD-dependent mechanism. Combining the two did not have an additive or synergic effect, again suggesting a common mechanism. Further investigations are now needed to determine whether acetylation of CypD, a post-translational modification favoring mitochondrial permeability transition, might be a new target to prevent resuscitation injury in post-CA syndrome.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical standards All experiments were approved by the Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research, in compliance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The manuscript does not contain clinical studies or patient data.

References

- Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB (2004) Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation* 109:2786–2791. doi:10.1161/01.CIR.0000131940.19833.85
- Alam MR, Baetz D, Ovize M (2015) Cyclophilin D and myocardial ischemia–reperfusion injury: a fresh perspective. *J Mol Cell Cardiol* 78:80–89. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.09.026
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Augeul L, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Gomez L, Robert D, Ovize M (2008) Increased mitochondrial calcium coexists with decreased reperfusion injury in postconditioned (but not preconditioned) hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:386–391. doi:10.1152/ajpheart.01035.2007
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 38:367–374. doi:10.1016/j.yjmcc.2004.12.001
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raïsky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* 111:194–197. doi:10.1161/01.CIR.0000151290.04952.3B
- Arrich J, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H (2016) Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD004128. doi:10.1002/14651858.CD004128.pub4
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska K, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434:652–658. doi:10.1038/nature03434
- Bochaton T, Crola-Da-Silva C, Pillot B, Villedieu C, Ferrera L, Alam MR, Thibault H, Strina M, Gharib A, Ovize M, Baetz D (2015) Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D. *J Mol Cell Cardiol* 84:61–69. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.03.017
- Callaway CW, Donnino MW, Fink EL, Geocadin RG, Golan E, Kern KB, Leary M, Meurer WJ, Peberdy MA, Thompson TM, Zimmerman JL (2015) Part 8: Post-Cardiac Arrest Care: 2015 American Heart Association Guidelines Update for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 132:S465–S482. doi:10.1161/CIR.0000000000000262
- Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleb 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* 124:901–911. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.039388
- Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaidi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, Argaud L (2014) Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol* 117:930–936. doi:10.1152/jappphysiol.00495.2014
- Cour M, Bresson D, Hernu R, Argaud L (2016) SOFA score to assess the severity of the post-cardiac arrest syndrome. *Resuscitation* 102:110–115. doi:10.1016/j.resuscitation.2016.03.00
- Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L (2011) Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol* 16:117–130. doi:10.1177/1074248410383174
- Cour M, Jahandiez V, Loufouat J, Ovize M, Argaud L (2015) Minor changes in core temperature prior to cardiac arrest influence outcomes: an experimental study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 20:407–413. doi:10.1177/1074248414562911
- Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L (2011) Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J* 32:226–235. doi:10.1093/eurheartj/ehq112

16. Gong P, Hua R, Zhang Y, Zuo H, Tang Z, Mei X, Zhang M, Cui J, Li C (2013) Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* 33:928–934. doi:10.1038/jcbfm.2013.33
17. Hausenloy DJ, Boston-Griffiths EA, Yellon DM (2012) Cyclosporin A and cardioprotection: from investigative tool to therapeutic agent. *Br J Pharmacol* 165:1235–1245. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01700.x
18. Heusch G, Gersh BJ (2017) The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge. *Eur Heart J* 38:774–784. doi:10.1093/eurheartj/ehw224
19. Huang CH, Tsai MS, Chiang CY, Su YJ, Wang TD, Chang WT, Chen HW, Chen WJ (2015) Activation of mitochondrial STAT-3 and reduced mitochondria damage during hypothermia treatment for post-cardiac arrest myocardial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 110:59. doi:10.1007/s00395-015-0516-3
20. Huang CH, Tsai MS, Hsu CY, Su YJ, Wang TD, Chang WT, Chen WJ (2011) Post-cardiac arrest myocardial dysfunction is improved with cyclosporine treatment at onset of resuscitation but not in the reperfusion phase. *Resuscitation* 82:S41–S47. doi:10.1016/S0300-9572(11)70150-2
21. Kristian T, Gertsch J, Bates TE, Siesjö BK (2000) Characteristics of the calcium-triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effects of cyclosporin A and ubiquinone O. *J Neurochem* 74:1999–2009. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0741999.x
22. Liu J, Wang Y, Zhuang Q, Chen M, Wang Y, Hou L, Han F (2016) Protective effects of cyclosporine A and hypothermia on neuronal mitochondria in a rat asphyxial cardiac arrest model. *Am J Emerg Med* 34:1080–1085. doi:10.1016/j.ajem.2016.02.066
23. Nagley P, Higgins GC, Atkin JD, Beart PM (2016) Multifaceted deaths orchestrated by mitochondria in neurons. *Biochim Biophys Acta* 1802:167–185. doi:10.1016/j.bbadis.2009.09.004
24. Neumar RW, Nolan JP, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, Callaway C, Clark RS, Geocadin RG, Jauch EC, Kern KB, Laurent I, Longstreth WT Jr, Merchant RM, Morley P, Morrison LJ, Nadkarni V, Peberdy MA, Rivers EP, Rodriguez-Nunez A, Sellke FW, Spaulding C, Sunde K, Vanden Hoek T (2008) Postcardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication. *Circulation* 118:2452–2483. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.190652
25. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes J, Kjaergaard J, Kuiper M, Pellis T, Støttrup P, Wanscher M, Wise MP, Åneman A, Al-Subaie N, Boesgaard S, Bro-Jeppesen J, Brunetti I, Bugge JF, Hingston CD, Juffermans NP, Koopmans M, Køber L, Langørgen J, Lilja G, Møller JE, Rundgren M, Rylander C, Smid O, Werer C, Winkel P, Friberg H (2013) Targeted temperature management at 33°C versus 36°C after cardiac arrest. *N Engl J Med* 369:2197–2206. doi:10.1056/NEJMoa131051
26. Patil KD, Halperin HR, Becker LB (2015) Cardiac arrest: resuscitation and reperfusion. *Circ Res* 116:2041–2049. doi:10.1161/CIRCRESAHA
27. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ, Vanden Hoek TL (2010) Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298:2164–2173. doi:10.1152/ajpheart.00994.2009
28. Tissier R, Chenoune M, Pons S, Zini R, Darbera L, Lidouren F, Ghaleh B, Berdeaux A, Morin D (2013) Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes. *Resuscitation* 84:249–255. doi:10.1016/j.resuscitation.2012.06.030
29. Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A (2012) Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res* 94:217–225. doi:10.1093/cvr/cvr315
30. Tsai MS, Barbut D, Wang H, Guan J, Sun S, Inderbitzen B, Weil MH, Tang W (2008) Intra-arrest rapid head cooling improves postresuscitation myocardial function in comparison with delayed postresuscitation surface cooling. *Crit Care Med* 36:434–439
31. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemaster JJ (2002) Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the non-immunosuppressive cyclosporin derivative NIM 811. *Mol Pharmacol* 62:22–29
32. Yang X, Liu Y, Yang XM, Hu F, Cui L, Swingle MR, Honkanen RE, Soltani P, Tissier R, Cohen MV, Downey JM (2011) Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol* 106:421–430. doi:10.1007/s00395-011-0165-0
33. Ye S, Weng Y, Sun S, Chen W, Wu X, Li Z, Weil MH, Tang W (2012) Comparison of the durations of mild therapeutic hypothermia on outcome after cardiopulmonary resuscitation in the rat. *Circulation* 125:123–129. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.062257
34. Yenari MA, Han HS (2012) Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischemia. *Nat Rev Neurosci* 13:267–278. doi:10.1038/nrn3174
35. Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, Sun G, Schaal DW, Sapolsky RM, Steinberg GK (2005) Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25:9794–9806. doi:10.1523/JNEUROSCI.3163-05.2005
36. Zhao P, Ji G, Xue H, Yu W, Zhao X, Ding M, Yang Y, Zuo Z (2014) Isoflurane postconditioning improved long-term neurological outcome possibly via inhibiting the mitochondrial permeability transition pore in neonatal rats after brain hypoxia-ischemia. *Neuroscience* 280:193–203. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.09.006

Résultats complémentaires

Certains résultats (non publiés) complètent notre travail : nous avons déterminé, à partir de mitochondries isolées de cerveau, l'activité de la sirtuine 3 afin de déterminer si les effets de l'hypothermie thérapeutique sur l'acétylation de la CypD impliquaient une modification de l'activité désacétylase de la sirtuine 3. Les mesures ont été réalisées en utilisant un kit de fluorescence dédiée (BPS Bioscience). Nous avons également mesuré par qPCR l'expression de la sirtuine 3 dans les mitochondries isolées de cerveau. Comme le montre la figure 16, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative entre les 3 principaux groupes sur les mitochondries isolées de cerveau.

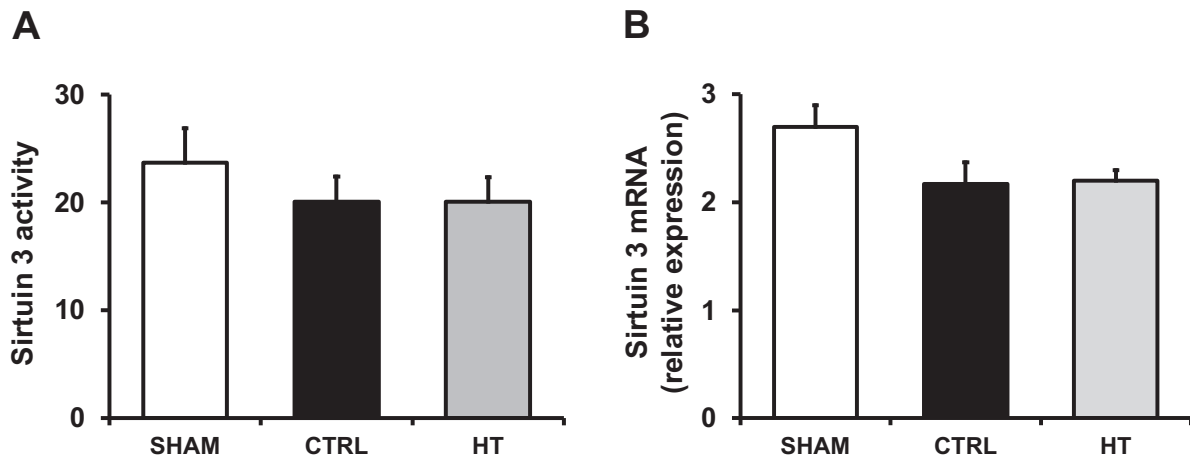


Figure 16 - Activité et expression de la sirtuine 3

L'activité de la sirtuine 3 (A) et l'expression de son ARN messager (mRNA) (B) ne présentaient pas de différence significative entre les animaux Sham, Contrôle (CTRL) et Hypothermie (HT).

Synthèse des résultats et discussion

Ce travail montre que l'hypothermie thérapeutique induite immédiatement à la reperfusion ainsi que l'inhibition pharmacologique du PTP par la NIM811 limitent de façon similaire la défaillance multiviscérale et la dysfonction mitochondriale dans notre modèle d'AC par rythme non choquable chez le lapin. L'association des deux traitements n'apporte pas d'effet bénéfique supplémentaire à deux heures de reperfusion.

La défaillance cardiovasculaire et les lésions cérébrales sont les deux principales composantes du syndrome post-AC.⁶ Notre étude confirme les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique induite dès le début de la reperfusion permettant de limiter les lésions cérébrales et myocardiques.^{438,450,467} Nous avons choisi d'utiliser notre modèle d'AC asphyxique pour étudier les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique car l'hypoxémie est une réalité clinique responsable de la majorité des AC de l'enfant et de l'adulte jeune,^{463,465} et le rythme non choquable est la modalité la plus fréquente d'AC.³ Notre étude soutient l'hypothèse que l'hypothermie est également efficace pour prévenir les lésions après un AC par rythme non choquable. Même si aucune étude prospective de haut niveau de preuve n'a démontré l'efficacité de l'hypothermie sur les AC par rythme non choquable, son usage dans cette indication figure dans les recommandations.^{39,56,57} Nous avons choisi un modèle d'hypothermie induite très rapidement à la reperfusion afin d'agir sur les lésions de reperfusion précoces et d'observer un effet protecteur. En effet, les études expérimentales ont montré que l'hypothermie devait être induite précocement pour obtenir des effets protecteurs.^{369,373,433-435} Il est d'ailleurs probable que les résultats contradictoires observées chez l'Homme sur la cible de la température à atteindre et les délais d'induction de l'hypothermie puissent être liées à l'impossibilité d'atteindre très rapidement une hypothermie à la reperfusion (c'est à dire dans les minutes suivant la RACS) minorant les effets bénéfiques de l'hypothermie. Ceci peut expliquer que le contrôle thermique semble être aussi efficace que l'hypothermie.⁹

Notre étude met une nouvelle fois en évidence les effets protecteurs de l'inhibition pharmacologique du PTP par la NIM811, dérivé non immunosuppresseur de la CsA.^{331,449} Nos résultats montrent le rôle majeur joué par l'ouverture du PTP dans les dégâts cellulaires consécutifs à l'AC réanimé. Ces données sont concordantes avec

celles obtenues par d'autres équipes.^{332,468} L'étude clinique CYRUS menée par Argaud *et al*⁶⁵ bien que négative, ne remet pas en cause ces résultats expérimentaux mais met en exergue la difficulté de la translation de traitements expérimentaux chez l'Homme. En effet, si l'injection immédiate de la CsA à la reperfusion était réalisable en laboratoire, CYRUS a montré toute la difficulté de sa réalisation en médecine pré-hospitalière.

L'association de l'hypothermie thérapeutique et de la NIM811 ne démontrait pas, dans notre étude, d'effet additif. Ce résultat suggère que les deux traitements partagent des mécanismes protecteurs communs. Néanmoins, nos données ne concernent que les 120 premières minutes suivants la RACS et il serait intéressant de tester les effets protecteurs de l'association de ces deux traitements également à distance de la reperfusion notamment sur le pronostic neurologique. Notre étude a permis de montrer qu'un mécanisme commun est l'inhibition de l'ouverture du PTP. En effet, tout comme l'injection de NIM811, l'hypothermie thérapeutique a permis d'inhiber l'ouverture du PTP et de préserver le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Notre étude a permis de démontrer cet effet sur le cœur et le cerveau, les deux principaux organes impliqués dans le syndrome post-AC. Ces résultats sont cohérents avec les quelques données disponibles dans la littérature,^{333,364,368,469,470} plus rares encore à partir de mitochondries cérébrales.^{469,471}

Les mécanismes protecteurs mitochondriaux de l'hypothermie thérapeutique restent encore largement méconnus. Pour aller plus loin dans la compréhension des mécanismes d'action de l'hypothermie sur le PTP, nous avons analysé ses effets sur l'acétylation de la CypD, une modification post-transcriptionnelle qui influence son interaction avec le PTP. En effet, l'acétylation de la CypD sur sa lysine 166 favorise l'ouverture du PTP. Dans notre modèle d'AC, l'hypothermie, ainsi que l'injection de NIM811, diminuaient l'acétylation de la CypD dans le cerveau. Cette hypothèse ouvre de nouvelles perspectives de recherche notamment sur les liens entre l'hypothermie et la sirtuine 3, protéine capable de désacétyler la CypD.¹⁰⁸

Etude n°3

Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: involvement of the RISK pathway in mitochondrial PTP-mediated neuroprotection

Vincent Jahandiez, Martin Cour, Maryline Abrial, Joseph Loufouat, Michel Ovize, Laurent Argaud

Publiée dans *Shock*

THERAPEUTIC HYPOTHERMIA AFTER CARDIAC ARREST: INVOLVEMENT OF THE RISK PATHWAY IN MITOCHONDRIAL PTP-MEDIATED NEUROPROTECTION

Vincent Jahandiez,^{*†‡} Martin Cour,^{*†‡} Maryline Abrial,[‡] Joseph Loufouat,[‡] Michel Ovize,[‡] and Laurent Argaud^{*†‡}

^{*}Hospices Civils de Lyon, Edouard Herriot Hospital, Medical Intensive Care Unit, Lyon, France;

[†]University of Lyon, Lyon 1 Claude Bernard University, Lyon-Est Medical School, Lyon, France; and

[‡]Inserm UMR 1060, CarMeN, Lyon, France

Received 4 May 2018; first review completed 7 Jun 2018; accepted in final form 13 Jul 2018

ABSTRACT—Therapeutic hypothermia is neuroprotective after cardiac arrest (CA) via poorly understood mechanisms. It may prevent mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening, an event which plays a pivotal role in ischemia-reperfusion injury. PTP is the main end-effector of the reperfusion injury salvage kinase (RISK) signaling pathway. We hypothesized that therapeutic hypothermia activates the RISK pathway, thereby preventing PTP opening and its deleterious neurological consequences after CA. Four groups of New Zealand White rabbits were subjected to 15 min of CA and 120 min of reperfusion: Control, HT (hypothermia at 32°–34°C), NIM (specific PTP inhibition with N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine at the onset of reperfusion), and HT+NIM. A Sham group only underwent surgery. The following measurements were taken: pupillary reflexes and brain damage biomarkers (NSE and S100 β), RISK pathway activation in brain cortex (total and phosphorylated forms of both protein kinase B [Akt] and extracellular signal-regulated kinase [ERK]) and PTP opening in isolated brain mitochondria. Therapeutic hypothermia and pharmacological PTP inhibition preserved the pupillary reflexes and prevented the increase in both NSE and S100 β ($P < 0.05$ vs. controls). These two interventions also enhanced ($P < 0.05$ vs. controls) the phospho-Akt/Akt ratio to a similar extent while preventing a CA-induced increase in phospho-ERK/ERK ratio. This Akt activation in the HT and NIM groups was associated with an attenuation of CA-induced PTP opening. In this model, therapeutic hypothermia promoted the activation of the RISK signaling pathway via Akt and limited CA-induced brain injury by preventing PTP opening.

KEYWORDS—Extracellular signal-regulated kinase (ERK), mitochondrial permeability transition pore, post-cardiac arrest syndrome, protein kinase B (Akt), reperfusion injury salvage kinase (RISK), therapeutic hypothermia

INTRODUCTION

Therapeutic hypothermia is the only adjuvant therapy to cardiopulmonary resuscitation (CPR) known to improve survival and neurologic outcomes after cardiac arrest (CA) in humans (1). Nevertheless, our understanding of the molecular mechanisms underlying neuroprotection by hypothermia is still incomplete and the subject of intense research (2). Current evidence suggests that therapeutic hypothermia decreases metabolic rate, attenuates calcium overload and oxidative stress, mitigates inflammation, and regulates cell signaling pathways after ischemia-reperfusion injury (2–4). The opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) plays a critical role in the pathophysiology of the post-CA syndrome (5–7). Experimentally, by mimicking the mitochondrial effects of cyclosporine A (CsA, i.e., the PTP reference inhibitor), therapeutic hypothermia prevents CA-induced organ dysfunction (5–7). However, the biological processes whereby therapeutic hypothermia inhibits PTP opening remain elusive (7).

Multiple pro-survival signaling pathways could prevent PTP opening (8) and great attention has focused on the reperfusion injury salvage kinase (RISK) pathway, which involves protein kinase B (Akt) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) (2, 8–10). Indeed, it has previously been shown that recruiting the RISK pathway may limit the myocardial consequences of ischemia-reperfusion (8, 9). In CA, limited data suggest that the cardiac benefits of hypothermia would involve the RISK pathway (11–13). However, it remains unknown whether hypothermia-induced neuroprotection is mediated by PTP inhibition through RISK activation.

Thus, we hypothesized that therapeutic hypothermia would limit brain injury after CA by activating the RISK pathway while inhibiting the PTP. To explore the potential relationship between these two phenomena, we compared the effects of hypothermia and specific pharmacological PTP inhibition *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

The investigation conformed to French laws and to the National Institutes of Health guidelines for ethical treatment. All experiments were approved by the Lyon I Claude Bernard University Committee for Animal Research.

Cardiac arrest model

Cardiac arrest and resuscitation were performed as previously described, using our well-validated rabbit CA model (6, 7, 14, 15). Briefly, adult male New Zealand White rabbits were anesthetized by xylazine and ketamine. Animals were shaved to facilitate external temperature control. A tracheotomy was

Address reprint requests to Laurent Argaud, MD, PhD, Medical Intensive Care Unit, Edouard Herriot Hospital, 5, Place d'Arsonval, 69437 Lyon Cedex 03, France. E-mail: laurent.argaud@chu-lyon.fr

VJ, MC, MA, JL, MO, LA conceived of the study, and participated in its design and coordination. VJ, MC, and JL performed animal experiment. VJ and MA carried out the biochemical assays. VJ, MC, and LA wrote the manuscript and performed the statistical analysis. MA and MO helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

The authors report no conflicts of interest.

DOI: 10.1097/SHK.0000000000001234

Copyright © 2019 by the Shock Society

performed and rabbits underwent mechanical ventilation. Central body temperature was continuously recorded using a thermistor inserted into the esophagus. A right internal jugular catheter and an ipsilateral carotid catheter were surgically placed. Temperature was maintained within a physiological range using heating pads. After a 15-min stabilization period, primary asphyxial CA was induced, using an intravenous (IV) injection of pancuronium bromide followed by a withdrawal of the mechanical ventilation. After 15 min of untreated CA, resuscitation was started with the resumption of mechanical ventilation, cardiac massage, and IV administration of epinephrine (20 µg/kg). Successful resuscitation was defined as the return of an organized cardiac rhythm for at least 3 min, with mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) above 20 mm Hg and 100 bpm, respectively.

Experimental protocol

Animals were assigned to the five following groups to obtain six living animals per group: sham-operated animals (SHAM), controls (CTRL, CA with 120 min of reperfusion) and three treated groups, i.e., therapeutic hypothermia (HT), specific pharmacological PTP inhibition (7, 14, 16) by IV bolus of 2.5 mg/kg N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine (NIM) at the onset of CPR and both interventions (HT+NIM). With a target temperature of 32°C to 34°C, hypothermia was induced in less than 20 min (by covering the shaved body with ice pack at the start of CPR) and maintained for 1 h, as previously described (7). At the end of the experiment (120 min), a blood sample was collected and the left side of the cerebral cortex was harvested.

Cerebral injury

Pupillary diameter and reactivity to light were both recorded at baseline and at the end of the protocol to assess clinical brainstem damage (15, 17, 18). Blood levels of Neuron Specific Enolase (NSE) and S100β protein, two sensitive markers of brain injury (6, 7), were determined at the end of the protocol using enzyme linked immunosorbent assay tests (Glory Science and Abnova, respectively).

Oxidative phosphorylation

Brain mitochondria were isolated by differential centrifugation as previously described (6, 7, 14, 15, 19). Briefly, brain tissue was placed in a cold isolation buffer (70 mM sucrose, 210 mM mannitol, 1 mM EGTA in Tris-HCl, pH 7.4) and finely minced and then homogenized in the same buffer (10 mL/g), using successively a Kontes tissue grinder and a Potter Elvehjem. The homogenate was centrifuged at 2,000 g for 3 min. The supernatant was poured through cheesecloth and centrifuged at 12,000 g for 10 min. The mitochondrial pellet was suspended and homogenized in the same buffer without calcium chelating agent. Mitochondrial respiratory function was measured using the polarographic method (6, 7, 14, 15). Freshly isolated mitochondria were suspended (250 µg/mL) in a buffer containing 100 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄ in 50 mM MOPS, pH 7.4 with 1 mg/mL defatted bovin serum albumin. Then, State 3 (200 µM adenosine diphosphate [ADP]-stimulated), State 4 (ADP-limited), and respiratory control index (RCI: State 3/State 4, a measure of mitochondrial coupling between oxygen consumption and ATP production) were determined by oxygraphy (Oroboros Oxygraph 2-K, Oroboros Instrument Corp, Innsbruck, Austria) in the presence of electron donors to complex I (5 mM Glutamate and 5 mM malate), as previously described (6, 7, 14, 15).

Mitochondrial permeability transition

Calcium retention capacity (CRC) was determined on fresh mitochondria isolated from cerebral cortex, using the calcium green 5-N (Molecular Probes, Eugene, Ore), as previously described (6, 7, 15). Briefly, Ca²⁺ pulses were added every minute to a medium (150 mM sucrose, 50 mM KCl,

2 mM KH₂PO₄, 5 mM Glutamate, 5 mM Malate in 20 mM Tris/HCl, pH 7.4) containing mitochondria. Following sufficient calcium loading (corresponding to CRC), extramitochondrial Ca²⁺ concentration abruptly increased, indicating a massive release of the accumulated Ca²⁺ by mitochondria due to PTP opening. CRC was also assessed after *in vitro* adjunction of 1 µM CsA (14).

Akt and ERK phosphorylation

Cytosolic proteins were extracted from snap frozen samples of cerebral cortex using an Active Motif kit. Western blotting was performed according to standard procedures (7, 20). Briefly, the equivalent of 30 µg to 50 µg of proteins was loaded on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Separated proteins were then transferred from the gel to polyvinylidene fluoride membranes and incubated overnight with primary antibodies (Cell Signaling, Danvers, Mass) recognizing phospho-Ser473-Akt (p-Akt), total Akt, phosphorylated ERK 42/44 (p-ERK), and total ERK 42/44 (total ERK). Afterward, the membranes were washed and incubated with appropriate secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif). Blots were developed using an ECL plus detection system (GE Healthcare, Horten, Norway) and relative band density was measured using Image Lab 4.0 software (Bio-Rad, Hercules, Calif).

Statistical analysis

Results were analyzed with the Graphpad Prism 6 software (GraphPad Software, La Jolla, Calif). Data are expressed as mean ± SEM or number (%). Comparisons of categorical variables were performed using Fisher exact test. Normality of continuous data was assessed using the Kolmogorov–Smirnov test and continuous variables were compared using one-way analysis of variance or Kruskal–Wallis test, as appropriate. Comparisons between time-based measurements within each group were performed with two-way analysis of variance with repeated measures on one factor. Statistical significance was defined as a *P* value < 0.05.

RESULTS

Thirty-four rabbits were included in the present study. Four animals died before the end of the experiments: three controls and one NIM-treated rabbit. Results of the remaining 30 rabbits (n = 6/group) are presented. At baseline, MAP, HR, and temperature were similar among the groups (*P* = NS). The duration of asphyxia before CA did not differ between groups (*P* = NS). The target temperature was reached in less than 20 min in all hypothermia-treated animals (data not shown).

Cerebral injury

In the control group, CA resulted in an increase in pupillary diameter (*P* < 0.05 vs. SHAM) with pupillary areflexia in 2/3 of rabbits (Table 1). After 120 min of reperfusion, controls also exhibited a significant increase in both NSE and S100β protein when compared with shams: 5.20 ± 0.19 versus 2.74 ± 0.33 ng/mL and 1205 ± 149 versus 272 ± 20 pg/mL, respectively (Fig. 1). Both hypothermia and NIM significantly limited brain damage, as assessed by pupillary examination and biomarkers of neuronal injury (Table 1 and Fig. 1).

TABLE 1. Pupillary examination

Group	Pupillary diameter (mm)		Pupillary reactivity (n, %)	
	Baseline	120 min reperfusion	Baseline	120 min reperfusion
SHAM	4.0 ± 0.3	4.3 ± 0.2 [†]	6/6 (100%)	6/6 (100%)
CTRL	4.0 ± 0.3	7.2 ± 0.6 [†]	6/6 (100%)	2/6 (33%)
HT	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.5 [†]	6/6 (100%)	5/6 (83%)
NIM	4.2 ± 0.3	4.8 ± 0.7 [†]	6/6 (100%)	4/6 (67%)
HT+NIM	4.3 ± 0.2	4.8 ± 0.5 [†]	6/6 (100%)	5/6 (83%)

^{*}*P* < 0.05 versus baseline.

[†]*P* < 0.05 versus CTRL.

CTRL indicates controls; HT, hypothermia; NIM, N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine.

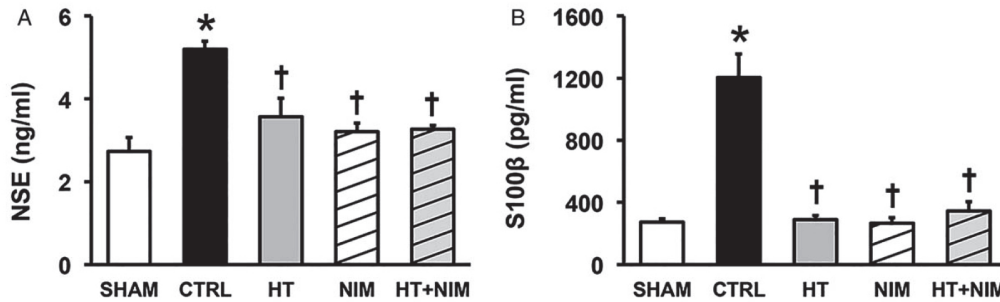


Fig. 1. **Biomarkers of cerebral injury.** Cardiac arrest in control animals (CTRL) resulted in a significant increase in both Neuron Specific Enolase (NSE) (A) and S100β protein (B) compared with the sham animals. This phenomenon was prevented by both hypothermia (HT) and N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine (NIM). Data are from six animals per group. * $P < 0.01$ versus SHAM; † $P < 0.05$ versus CTRL.

Oxidative phosphorylation

As shown in Figure 2, State 3 was significantly decreased after CA in brain mitochondria isolated from controls when compared with sham animals ($P < 0.05$). Hypothermia and NIM significantly improved ADP-stimulated respiration without changing State 4 (Fig. 2). As a result, both treatments improved mitochondrial coupling by enhancing the RCI ($P < 0.05$ vs. controls).

Mitochondrial permeability transition

The amount of Ca^{2+} required to open the PTP (CRC) after CA significantly decreased in controls ($P < 0.001$ vs. sham animals) (Fig. 3). Hypothermia, as well as NIM, resulted in a significant increase in CRC compared with controls ($P < 0.05$) (Fig. 3). With the exception of the controls, *in vitro* addition of CsA significantly ($P < 0.05$) enhanced CRC to near SHAM values (Fig. 3).

Effect of therapeutic hypothermia on Akt and ERK phosphorylation

In the control group, when compared with sham animals, Western blot analysis showed that the level of p-Akt did not change after resuscitated CA, whereas the level of ERK

phosphorylation significantly increased (Fig. 4). Conversely, hypothermia and/or NIM were associated with Akt activation while preventing ERK phosphorylation (Fig. 4).

DISCUSSION

In the present study, therapeutic hypothermia limited CA-induced brain injury with both Akt activation and PTP inhibition. Specific pharmacological PTP inhibition mimicked the effects of therapeutic hypothermia regarding neuroprotection and recruitment of the RISK pathway. A combination of NIM and hypothermia did not confer additive protection, further suggesting a common pathway of protection involving Akt.

Limiting secondary brain injury is one of the major challenges facing intensivists caring for CA patients (21). To date, therapeutic hypothermia is the only treatment with proven efficacy on neurological outcomes after CA (1). The benefits of therapeutic hypothermia are thought to be greatest when achieved as early and as fast as possible after CA (21, 22). In the present study, we chose to cool animals quickly to enhance neuroprotection and to target early endogenous mechanisms potentially involved in the pathogenesis of brain injury. Thus, we confirmed, on the basis of relevant clinical

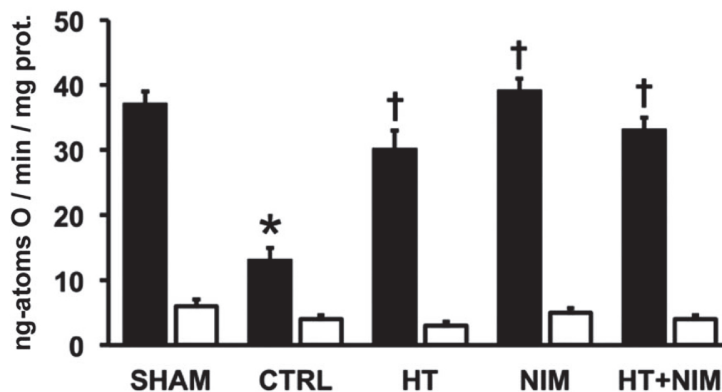


Fig. 2. **Oxidative phosphorylation.** Impairment of oxidative phosphorylation (i.e., a decrease in State 3 ADP-stimulated respiration, black bars) after cardiac arrest in controls (CTRL) was limited by both hypothermia (HT) and N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine (NIM) ($n = 6$ /group). State 4 ADP-limited respiration (white bars) did not differ among groups. * $P < 0.05$ versus SHAM; † $P < 0.05$ versus CTRL.

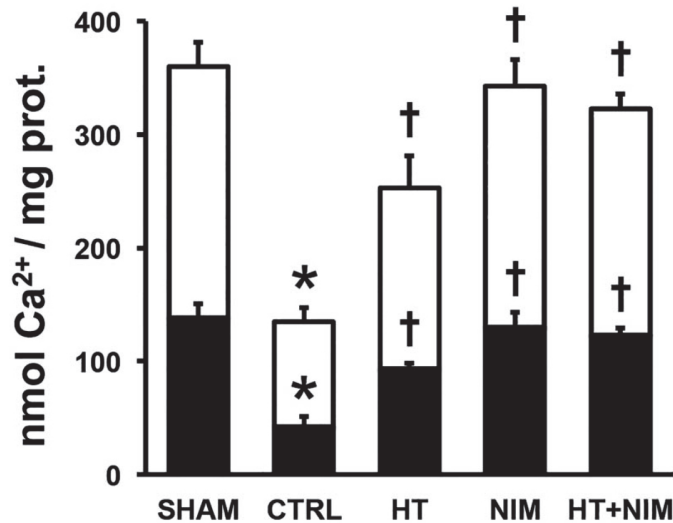


FIG. 3. **Mitochondrial permeability transition.** Calcium retention capacity (CRC) significantly decreased after cardiac arrest in controls (CTRL); hypothermia (HT), as well as N-methyl-4-isoleucine-cyclosporine (NIM), significantly increased CRC (n = 6/group). *In vitro* adjuvance of 1 μM CsA (white bars) increased the amount of Ca²⁺ required to open the PTP in all treated groups. *P < 0.05 versus SHAM; †P < 0.05 versus CTRL.

and biological data (17, 18, 21), the neuroprotective effects of therapeutic hypothermia when applied at the onset of resuscitation (2, 5, 7, 22).

Mitochondrial PTP opening has been recognized as playing a key role in reperfusion injury, including in the brain (5–8, 15, 23). Under physiologic conditions, the inner mitochondrial membrane is impermeable to most metabolites and ions, and the PTP is in a closed conformation (23–25). Following ischemia-reperfusion insult, such as resuscitated CA, the restoration of blood flow after a period of ischemia favors calcium overload, excessive production of reactive oxygen species, adenine nucleotide depletion, and correction of intracellular pH, all of them increasing the susceptibility of PTP opening (23–25). This phenomenon results in the loss of membrane integrity, rapid collapse of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), uncoupling of the respiratory chain with possible fatal decline in ATP levels and the release of pro-apoptotic factors such as cytochrome *c* (23–25). In the present study, we showed that therapeutic hypothermia prevented energetic impairment in brain mitochondria by reducing Ca²⁺ sensitivity to PTP opening. These results confirmed the findings of the few previous studies that examined the effects of therapeutic hypothermia on brain mitochondria after CA (5–7, 26). However, based on these reports, the cell signaling mechanism, whereby hypothermia preserves mitochondrial functions after CA, remained largely unknown.

As a therapeutic target, structure and regulation of mitochondrial PTP have been extensively studied for decades (23, 25). While the exact PTP structure is still debated, it is admitted that the calcium-sensitive matrix protein cyclophilin-D (CypD) is the main regulator of permeability transition (23, 25). Indeed, both pharmacological inhibition of CypD (e.g., by CsA) and genetic loss of CypD delay PTP opening and limit ischemia-reperfusion-induced cell death (16, 23, 24, 27). In the present

study, three lines of results suggested that hypothermia prevented brain mitochondrial dysfunction in a CypD-dependent manner. First, hypothermia mimicked both the neuroprotective and the mitochondrial effects of NIM (a CsA derivative devoid of immunosuppressive effects) that specifically binds to CypD. Second, the combination of these two therapeutic approaches (i.e., hypothermia and NIM) did not enhance the protection at both the clinical and cellular levels, suggesting a common mediator and/or end-effector. Of note, we cannot definitely exclude subtle synergic neuroprotection that we were unable to highlight in our experimental conditions.

Third, only mitochondria isolated from control animals, i.e., without *in vivo* interventions targeting CypD, lost the ability to dramatically increase CRC in the presence of CsA *in vitro*. In addition, the emerging key role of CypD in this field has been reinforced by a recent study from our group showing that therapeutic hypothermia prevented CypD acetylation in brain, i.e., a post-translational modification favoring PTP opening (7). This poses the question of what are the upstream signaling pathways involved in the hypothermic PTP-mediated neuroprotection.

Several signaling pathways are thought to be involved in cellular protection after ischemia-reperfusion injury, the best established being the RISK pathway (8, 9, 24, 28). The concept of the RISK pathway emerged two decades ago in the setting of cardioprotection with the identification of innate pro-survival protein kinases, including Akt and ERK, which are able to prevent cell death when activated (8, 9). PTP has been identified as the end-effector of this signaling pathway (8, 9). In the present study, we did not use classical protein kinase inhibitors to examine the role of the RISK pathway in the cerebral cortex, owing to the impermeability of the blood–brain barrier to such molecules (3). We chose another pharmacological approach, using specific PTP inhibitors known to cross the blood–brain

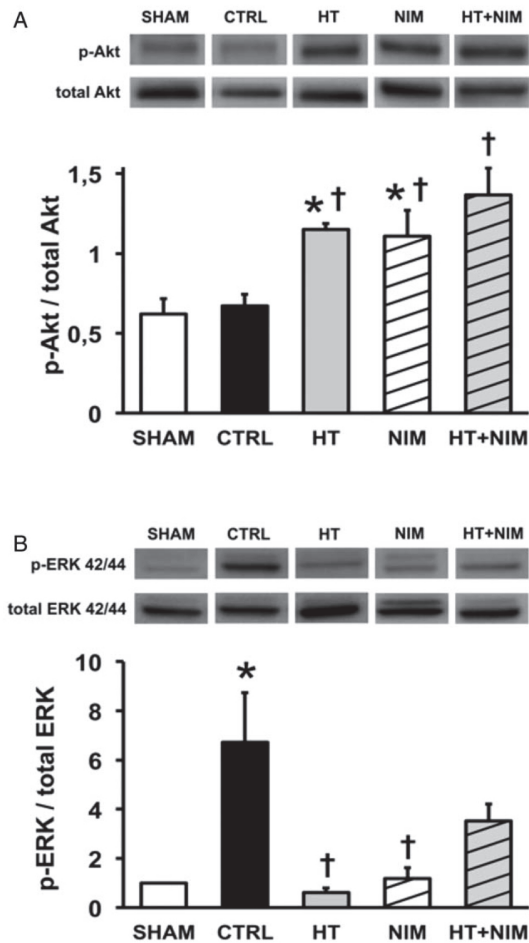


FIG. 4. Akt and ERK phosphorylation. When compared with controls (CTRL), hypothermia (HT) and N-methyl-L-isoleucine-cyclosporine (NIM) induced a significant increase in Protein kinase B (Akt) phosphorylation (A) and prevented Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) phosphorylation (B) (n = 4–6/group). $P < 0.05$ versus SHAM; $†P < 0.05$ versus CTRL.

barrier under our experimental conditions (7, 14, 15). We found that hypothermia-induced PTP inhibition in brain mitochondria was associated with Akt phosphorylation (i.e., Akt activation). Our results agree with a previous study in experimental stroke which showed that Akt activity was significantly higher in rats treated with hypothermia after focal cerebral ischemia (3). Hypothermia also prevented mitochondrial outer membrane disruption, as assessed by cytochrome *c* release, thus linking preservation of mitochondrial functions to Akt recruitment (3). To further explore the implication of the RISK pathway, we assessed ERK activation, another important signaling kinase (9). We found that the activity of ERK was increased in controls but not in hypothermic animals. These results should be cautiously interpreted following CA (29–31). ERK activation has been found to increase with therapeutic hypothermia (29), though several reports also suggest either the lack of a meaningful role of ERK activation (30) or even a deleterious effect of ERK phosphorylation after brain injury (31). Several

downstream targets of the RISK signaling pathway have been previously identified (8, 9). Among them, glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) has raised particular attention since its phosphorylation has been linked to the inhibition of the PTP (8, 9). However, as previously reported in focal brain ischemia–reperfusion injury (3), hypothermia seems to prevent GSK3 β phosphorylation in our model (data not shown), suggesting that this kinase did not play any important role in hypothermia-induced PTP inhibition. Future studies are needed to decipher how the RISK pathway prevents mitochondrial permeability transition after hypothermia in the setting of cardiac arrest. Altogether, our results suggest that hypothermia inhibits CypD-dependent PTP opening through activation of Akt. Thus, Akt appears to be a promising target to prevent CA-induced brain damage.

In summary, the present study shows that therapeutic hypothermia, when applied at reperfusion, confers protection against brain resuscitation injury by inhibiting PTP opening along with the activation of the Akt component of the pro-survival RISK pathway.

REFERENCES

1. Arrich J, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H: Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD004128, 2016.
2. Yenari MA, Han HS: Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischemia. *Nat Rev Neurosci* 13(4):267–278, 2012.
3. Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, Sun G, Schaal DW, Sapolsky RM, Steinberg GK: Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* 25(42):9794–9806, 2005.
4. D’Cruz BJ, Logue ES, Falke E, DeFranco DB, Callaway CW: Hypothermia and ERK activation after cardiac arrest. *Brain Res* 1064(1–2):108–118, 2005.
5. Gong P, Hua R, Zhang Y, Zhao H, Tang Z, Mei X, Zhang M, Cui J, Li C: Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab* 33(6):928–934, 2013.
6. Cour M, Jahandiez V, Loufouat J, Ovize M, Argaud L: Minor changes in core temperature prior to cardiac arrest influence outcomes: an experimental study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 20(4):407–413, 2015.
7. Jahandiez V, Cour M, Bochaton T, Abrial M, Loufouat J, Gharib A, Varennes A, Ovize M, Argaud L: Fast therapeutic hypothermia prevents post cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability inhibition. *Basic Res Cardiol* 112(4):35, 2017.
8. Hausenloy DJ, Barrabes JA, Bøtker HE, Davidson SM, Di Lisa F, Downey J, Engstrom T, Ferdinandy P, Carbrera-Fuentes HA, Heusch G, et al.: Ischaemic conditioning and targeting reperfusion injury: a 30 year voyage of discovery. *Basic Res Cardiol* 111(6):70, 2016.
9. Rossello X, Yellon DM: The RISK pathway and beyond. *Basic Res Cardiol* 113(1):2, 2017.
10. Zhao H: Ischemic postconditioning as a novel avenue to protect against brain injury after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 29(5):873–885, 2009.
11. Hsu CY, Huang CH, Chang WT, Chen HW, Cheng HJ, Tsai MS, Wang TD, Yen ZS, Lee CC, Chen SC, et al.: Cardioprotective effect of hypothermia for postresuscitation myocardial dysfunction. *Shock* 32(2):210–216, 2009.
12. Rungtatscher A, Linardi D, Giacomazzi A, Tessari M, Menon T, Mazzucco A, Faggian G: Cardioprotective effects of α -opioids receptor agonist vs. mild therapeutic hypothermia in a rat model cardiac arrest with extracorporeal life support. *Resuscitation* 84(2):244–248, 2013.
13. Shao ZH, Sharp WW, Wojcik KR, Li CQ, Han M, Chang WT, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ, Vanden Hoek TL: Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 298(6):H2164–H2173, 2010.
14. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L: Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J* 32(2):226–235, 2011.
15. Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaidi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, et al.: Ubiquitous protective effects of

- cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol* (1985) 117(8):930–936, 2014.
16. Waldmeier PC, Feldtrauer JJ, Qian T, Lemaster JJ: Inhibition of the mitochondrial permeability transition by the nonimmunosuppressive cyclosporin derivative NIM 811. *Mol Pharmacol* 62(1):22–29, 2002.
 17. Portran P, Cour M, Hernu R, de la Salle S, Argaud L: Pupillary abnormalities in non-selected critically ill patients: an observational study. *J Thorac Dis* 9(8):2528–2533, 2017.
 18. Zhao D, Weil MH, Tang W, Klouche K, Wann SR: Pupil diameter and light reaction during cardiac arrest and resuscitation. *Crit Care Med* 29(4):825–828, 2001.
 19. Kristian T, Gertsch J, Bates TE, Siesjö BK: Characteristics of the calcium-triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effects of cyclosporin A and ubiquinone O. *J Neurochem* 74(5):1999–2009, 2000.
 20. Harisseh R, Pillot B, Gharib A, Augeul L, Gallo-Bona N, Ferrera R, Loufouat J, Delale T, Allas S, Abribat T, et al.: Unacylated ghrelin analog prevents myocardial reperfusion injury independently of permeability transition. *Basic Res Cardiol* 112(1):4, 2017.
 21. Nolan JP, Berg RA, Bernard S, Bobrow BJ, Callaway CW, Cronberg T, Koster RW, Kudenchuk PJ, Nichol G, Perkins GD, et al.: Intensive care medicine research agenda on cardiac arrest. *Intensive Care Med* 43(9):1282–1293, 2017.
 22. Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleh B, Zini R, Dubois-Randé JL, Carli P, et al.: Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes in rabbits. *Circulation* 124(8):901–911, 2011.
 23. Bernardi P, Di Lisa F, Fogolari F, Lippe G: From ATP to PTP and back: a dual function for the mitochondrial ATP synthase. *Circ Res* 116(11):1850–1862, 2015.
 24. Cour M, Gomez L, Mewton N, Ovize M, Argaud L: Postconditioning: from the bench to bedside. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 16(2):117–130, 2011.
 25. Alam MR, Baetz D, Ovize M: Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. *J Moll Cell Cardiol* 78:80–89, 2015.
 26. Liu J, Wang Y, Zhuang Q, Chen M, Wang Y, Hou L, Han F: Protective effects of cyclosporine A and hypothermia on neuronal mitochondria in a rat asphyxial cardiac arrest model. *Am J Emerg Med* 34(6):1080–1085, 2016.
 27. Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D, Ovize M: Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition pore prevents lethal reperfusion injury. *J Moll Cell Cardiol* 38(2):367–374, 2005.
 28. Hadebe N, Cour M, Lecour S: The SAFE pathway, is this a promising target? *Basic Res Cardiol* 113(2):9, 2018.
 29. Hicks SD, Parmele KT, DeFranco DB, Klann E, Callaway CW: Hypothermia differentially increases extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase/c-Jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyxial cardiac arrest. *Neuroscience* 98(4):677–685, 2000.
 30. Castaneda D, Zhao H, Mochly-Rosen D, Steinberg GK: Activating delta-PKC antagonizes the protective effect of ERK1/2 inhibition against stroke in rats. *Brain Res* 1251:256–261, 2009.
 31. Cho DG, Mulloy MR, Chang PA, Johnson MD, Aharon AS, Robison TA, Buckles TL, Byrne DW, Drinkwater DC Jr: Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway by U0126 attenuates neuronal damage following circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 127(4):1033–1040, 2004.



Synthèse des résultats et discussion

Ce travail montre, dans notre modèle d'AC par rythme non choquable chez le lapin, que l'hypothermie thérapeutique prévient les lésions cérébrales après AC en inhibant l'ouverture du PTP et en activant la voie RISK.

Les lésions cérébrales sont responsables de la majorité des décès après AC et constituent donc un enjeu thérapeutique majeur.⁶ Dans notre modèle d'AC, l'hypothermie démontrent des effets neuroprotecteurs lorsqu'elle est appliquée immédiatement à la reperfusion. L'inhibition pharmacologique du PTP par la NIM811 entraîne une neuroprotection similaire. De façon intéressante, dans une étude ancillaire de l'étude CYRUS que nous avons menée, nous avons également observé une baisse significative du taux de NSE chez les patients traités par la CsA.⁴⁷² Néanmoins, les taux de NSE observés chez les patients traités par CsA bien qu'inférieurs au groupe contrôle, restaient à des valeurs très pathologiques.

L'hypothermie thérapeutique prévient, dans notre étude, l'ouverture du PTP. L'un des mécanismes d'action semble impliquer la CypD. En effet, dans notre étude, la NIM811 et l'hypothermie avaient des effets neuroprotecteurs similaires sans effet protecteur additif. De plus, l'adjonction de CsA *in vitro* permettait de restaurer la CRC dans les groupes protégés.

Nos résultats sont en faveur d'une activation d'Akt par l'hypothermie. Ainsi, notre étude permet de confirmer dans le domaine de l'AC, l'implication de la voie RISK qui avait été mise en évidence dans des modèles d'AVC.³⁷⁹ Nous n'avons pas retrouvé d'implication de ERK dans les mécanismes neuroprotecteurs de l'hypothermie thérapeutique.

Etude n°4

Loss of cyclophilin D improves long-term outcomes after hypothermia-treated cardiac arrest

Vincent Jahandiez, Martin Cour, Bruno Pillot, Radu Bolbos,
Marlene Wiart, Michel Ovize, Laurent Argaud

En préparation pour soumission

Résumé

Introduction Malgré l'utilisation de l'hypothermie thérapeutique, le pronostic des patients après un arrêt cardiaque (AC) réanimé reste sombre. La majorité d'entre eux décède en réanimation d'une défaillance multi-viscérale conséquence des lésions de reperfusion. L'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP) provoquée par la fixation de la cyclophiline D (CypD) est un mécanisme central des lésions de reperfusion. Nous avons émis l'hypothèse que l'inhibition complète de la fixation de la CypD au PTP permettrait d'améliorer les effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique à court et long terme après AC.

Méthodes Dans un nouveau modèle expérimental, des souris adultes ont été soumises à un AC non traité de 5 minutes avant réanimation. Les animaux ont été répartis en 5 groupes : groupe contrôle (CTRL, AC uniquement), groupe hypothermie (HT, hypothermie à 32°C-34°C induite par un refroidissement externe à la reperfusion), groupe sans CypD (CypD^{-/-}), groupe HT+CypD^{-/-} et groupe SHAM. Dans une première série d'expérimentations, ont été réalisés à 150 minutes de reperfusion : des mesures échocardiographiques, des mesures de la susceptibilité d'ouverture du PTP dans les mitochondries isolées du cœur et du cerveau et les dosages sanguins de troponine Ic et de S100β. Dans une seconde série d'expérimentations, les animaux ont été replacés en cage après la réanimation pour une évaluation neurologique (IRM cérébrale à J1 et score de fonction neurologique à J7) et de la survie à long terme (J7).

Résultats Les caractéristiques de l'AC étaient identiques entre les groupes. Les groupes CypD^{-/-} et HT+CypD^{-/-} nécessitaient un massage cardiaque de durée significativement plus courte avant restauration d'une activité circulatoire spontanée (RACS) et présentaient un taux de RACS plus élevé que les groupes HT et CTRL ($p < 0.05$). L'hypothermie et la suppression de la CypD limitaient les lésions cérébrales et myocardiques. La survie à 7 jours différait de manière significative entre les groupes avec 7% des animaux vivants dans le groupe CTRL, 20% dans le groupe CypD^{-/-}, 43% dans le groupe HT et 73% dans le groupe HT+CypD^{-/-}.

Conclusion L'inhibition complète du mécanisme CypD-dépendant d'ouverture du PTP permet d'améliorer l'efficacité de la réanimation initiale ainsi que de l'hypothermie thérapeutique sur la survie à long terme.

Introduction

L'hypothermie thérapeutique est le seul traitement ayant démontré son efficacité pour limiter la défaillance multiviscérale après un arrêt cardiaque (AC) réanimé permettant ainsi d'améliorer le pronostic neurologique et la survie des patients.^{1,2} Néanmoins, la survie des patients pris en charge en réanimation dans les suites d'un AC reste très sombre.^{3,4} Cette défaillance multiviscérale, composée principalement d'une atteinte neurologique et cardiovasculaire, est la conséquence des lésions cellulaires d'ischémie-reperfusion. Si la durée de l'ischémie est bien sûr un élément majeur des lésions cellulaires, on sait désormais que la reperfusion, qui débute au moment du massage cardiaque, entraîne, par elle-même, des dégâts cellulaires importants.^{5,6} Une intense recherche expérimentale s'est développée pour mieux comprendre les mécanismes protecteurs de l'hypothermie thérapeutique et ainsi espérer améliorer son efficacité sur la prévention des lésions de reperfusion. L'un de ces mécanismes d'action implique l'inhibition de l'ouverture, à la reperfusion, d'un méga-canal de la membrane mitochondriale interne appelé pore de transition de perméabilité (PTP).⁷⁻¹⁰ En effet, dans les premiers instants de la reperfusion, l'ouverture du PTP provoque l'entrée d'eau et d'électrolytes dans la mitochondrie, un arrêt du fonctionnement de la chaîne respiratoire et la libération de facteurs pro-apoptotiques pouvant aboutir à la mort cellulaire.^{11,12} L'ouverture du PTP est déclenchée par la fixation au pore d'une protéine mitochondriale, la cyclophiline D (CypD).^{11,12} Notre équipe a récemment montré que l'hypothermie inhibait l'ouverture du PTP par un mécanisme dépendant de la CypD.¹⁰ Néanmoins, nous avons observé une inhibition du PTP plus forte avec des injections de ciclosporine A (inhibiteur de référence de la fixation de la CypD au PTP). Ces résultats laissent suggérer qu'une

inhibition complète de la fixation de la CypD au PTP pourrait améliorer les effets protecteurs mitochondriaux de l'hypothermie. Nous avons testé, uniquement à court terme (120 minutes de reperfusion), l'association de l'hypothermie et d'une injection de CsA à la reperfusion et nous n'avons pas observé d'effets additifs.

Ainsi, nous avons voulu tester, dans ce travail, les effets protecteurs à long terme d'une inhibition complète du mécanisme CypD-dépendant d'ouverture PTP en utilisant des animaux déficients en CypD. Nous avons également fait l'hypothèse que l'inhibition complète de la fixation de la CypD au PTP (provoquée par l'absence de CypD) permettrait d'améliorer l'efficacité de l'hypothermie thérapeutique sur le pronostic à long terme. Pour cela, nous avons mis au point un nouveau modèle animal d'AC sur des souris déficientes en CypD et sur lesquelles nous avons appliqué une hypothermie thérapeutique.

Matériel et méthodes

Les expérimentations sont conformes à la législation française ainsi qu'au National Research Council "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Academy Press, Washington, DC, 1996). Toutes les expérimentations ont été approuvées par le Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de l'Université Claude Bernard Lyon 1.

Animaux

Les souris déficientes en CypD (CypD^{-/-}) de fond génétique C57Bl6/SV129 ont été fournies par le laboratoire de Stanley Korsmeyer (Dana Farber Cancer Institute).¹³ Les souris mâles wild-type (WT) et CypD^{-/-} étaient âgées de 8 à 12 semaines et d'un poids de 20 à 30g. Les souris ont été élevées avec un accès libre à l'eau et à l'alimentation et exposées à un cycle jour-nuit de 12 heures.

Développement d'un nouveau modèle murin d'arrêt cardiaque

Nous avons choisi de développer un nouveau modèle murin d'AC asphyxique avec rythme non choquable car les données épidémiologiques montrent que l'asystole et les rythmes sans pouls sont les principales modalités électriques d'AC chez l'Homme.¹⁴ Après la phase de mise au point du modèle, la succinylcholine est le curare qui a été retenu car il permettait d'obtenir un blocage neuromusculaire satisfaisant et sa très courte durée d'action éliminait tous risques de blocage neuromusculaire résiduel de l'animal lors de son réveil. Une précédente étude avait fait état de difficultés à développer un modèle asphyxique d'AC chez la souris car les auteurs ne parvenaient pas à identifier le moment précis de l'AC, la souris présentant une activité électrique

résiduelle après AC de longue durée.¹⁵ Pour résoudre cette difficulté, nous avons utilisé l'échographie cardiaque transthoracique (ETT) pour visualiser le ventricule gauche et constater le moment précis de l'AC.

Description du modèle d'arrêt cardiaque

Les souris sont anesthésiées par une injection intrapéritonéale de kétamine (100 mg/kg, Imalgene®) et de xylazine (5 mg/kg, Rompun®). Au cours de la préparation chirurgicale, la température centrale est mesurée et maintenue à sa valeur physiologique grâce à un système comprenant une table chauffante et un capteur de température rectal (sonde à thermistance) permettant de transmettre la température de l'animal au régulateur de température de la table chauffante (Physiosuite®, Kent Scientific). La température du bloc opératoire est maintenue à 25°C. La trachée de la souris est intubée par voie orale à l'aide d'un cathéter de calibre 22G et une ventilation mécanique est ensuite débutée avec un ventilateur (Physiosuite®, Kent Scientific). Les paramètres de ventilation comprennent un volume courant de 6,5 µl/g et une fréquence respiratoire de 150/minutes (ajustée afin de maintenir le dioxyde de carbone expiré (EtCO₂) dans les limites physiologiques), une pression expiratoire positive à 2 cm H₂O et une fraction inspirée en oxygène (FiO₂) à 0,4. Un électrocardiogramme (ECG), obtenu au moyen d'aiguilles placées en sous-cutanée, est enregistré en continu. La pression artérielle moyenne non invasive (PAM) est mesurée par la méthode du cuff-tail (Kent Scientific). Pour les animaux soumis à une surveillance hémodynamique invasive, la PAM est mesurée à l'aide d'un cathéter Millar 1.4F (Millar Instruments Inc) inséré dans l'artère carotide interne droite. Un micro-cathéter PE-10 purgé par du sérum salé à 0,9% hépariné est inséré dans la veine jugulaire interne gauche. Une période de stabilisation de 5 minutes est respectée avant le début de l'expérimentation.

Les souris sont ensuite paralysées par une injection intraveineuse (IV) de succinylcholine (1 mg/kg). L'AC asphyxique est provoqué par l'arrêt de la ventilation mécanique. L'AC est confirmé par ETT à l'aide d'une sonde de 13 MHz (Vivid 7, GE Medical Systems). Après 5 minutes d'AC, la réanimation cardio-pulmonaire (RCP) débute par une reprise de la ventilation mécanique à fréquence respiratoire élevée (220/minute) pendant les 15 premières minutes associée à un massage cardiaque externe par compressions thoraciques délivrées au doigt à une vitesse de 300 à 350 battements par minute (bpm). Le même investigateur a effectué la réanimation pour tous les animaux. Une injection unique d'adrénaline par voie IV (0,1 mg/kg) après une période de massage cardiaque d'une minute a été réalisée. La restauration d'une activité circulatoire spontanée (RACS) était définie par un rythme cardiaque organisé pendant au moins 3 minutes avec une fréquence cardiaque supérieure à 200 bpm et était confirmée par une ETT. Au cours de la première heure de reperfusion, les animaux recevaient une injection IV de 0,2 ml de bicarbonate de sodium à 2,1% (NaHCO₃). En l'absence de RACS après 5 minutes, la réanimation était arrêtée.

Protocole expérimental

Dans chaque série d'expérimentation (voir ci-dessous), les animaux ont été randomisés (figure 1A) dans l'un des cinq groupes suivants : i) groupe d'animaux Sham ne subissant que la chirurgie (SHAM), ii) groupe d'animaux contrôles (CTRL, AC appliqués à des souris WT), iii) groupe d'animaux traités par hypothermie (HT, souris WT traitées par hypothermie à la reperfusion), iv) groupes d'animaux sans CypD (CypD^{-/-}, AC appliqué à des souris CypD^{-/-}) et v) groupe d'animaux CypD^{-/-} sur lesquelles est appliqué une hypothermie (HT+CypD^{-/-}). L'hypothermie est appliquée au début de la réanimation grâce à une compresse humidifiée avec de l'eau glacée

recouvrant l'animal. La température cible du système homéothermique était également abaissée à 33°C. Après une heure de reperfusion, les animaux sont réchauffés à une vitesse de 0,3 à 0,4°C/5 minutes en retirant le dispositif de refroidissement et en augmentant progressivement la température cible du système homéothermique (figure 1B).

Deux séries d'expérimentation ont été nécessaires pour effectuer toutes les expérimentations. Dans une première série (protocole 1, n=10 à 24/groupe), les animaux ont été randomisés pour obtenir dix animaux vivants par groupe à 150 minutes de reperfusion. À la fin de l'expérimentation, un échantillon de sang puis le cerveau et cœur sont prélevés. Dans la deuxième série d'expérimentation (protocole 2, n=15-30/groupe), les cathéters étaient retirés, les plaies chirurgicales suturées et la ventilation mécanique était maintenue jusqu'à la reprise d'une ventilation spontanée. La souris était ensuite extubée. Après extubation, l'animal recevait une injection de 0,2 ml de bicarbonate de sodium 2,1% et 0,3 ml de sérum salé 0,9% par voie sous-cutanée et était placée dans une couveuse avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. L'état neurologique de ces animaux ainsi que le taux de survie ont été évalués jusqu'à J7. Les animaux ont reçu une injection deux fois par jour de 0,5 ml de sérum salé 0,9% par voie sous-cutanée afin d'assurer une hydratation suffisante. En cas de décès, l'heure exacte a été déterminée grâce à un système de vidéosurveillance enregistrant les souris 24h/24.

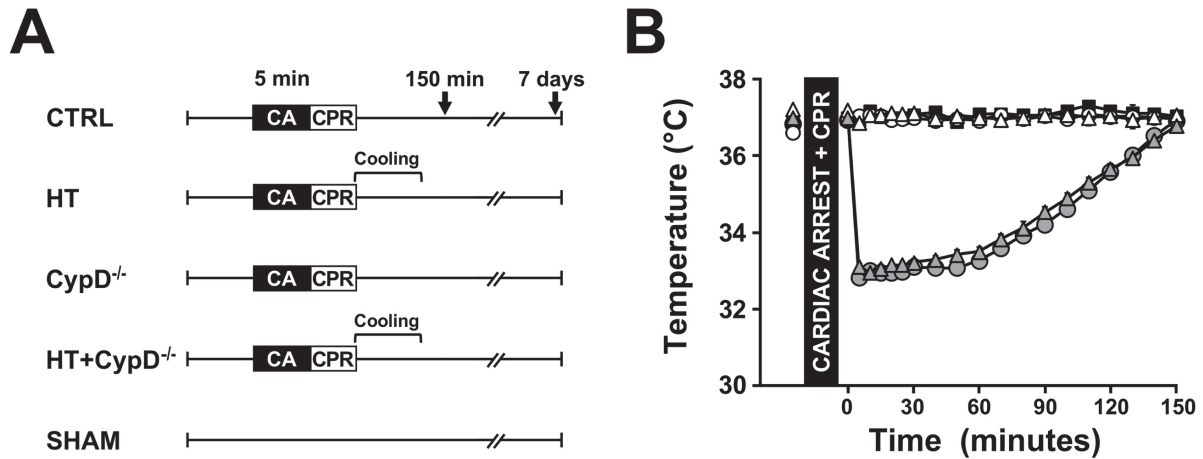


Figure 1 - Experimental protocol

A Controls (CTRL), Hypothermia 32-34°C (HT) or cyclophilin D knock-out (CypD^{-/-}) and hypothermia+CypD^{-/-} mice (HT+CypD^{-/-}) were subjected to 5 minutes of primary asphyxial cardiac arrest (CA). CA was followed by cardiopulmonary resuscitation (CPR). In a first set of experiment (**n=10-24/group**), reperfusion was maintained for 150 minutes prior to animal sacrifice to achieve blood sampling and mitochondrial assays. In the second set (**n=15-30/group**), mice were weaned from mechanical ventilation and returned to their cage for 7-days survival follow-up.

B Core temperature was monitored before CA and throughout the experiment in CTRL (black square), HT (gray circle), CypD^{-/-} (white triangle), HT+CypD^{-/-} (gray triangle) and SHAM (white circle).

Evaluation des atteintes cardiaques et cérébrales

La fraction de raccourcissement de la surface du ventricule gauche (VG) est mesurée au début de l'expérimentation et après 120 minutes de reperfusion par ETT avec une sonde de 13 MHz (Vivid 7, GE Medical Systems). Des échantillons de sang sont prélevés après 150 minutes de reperfusion. Les taux plasmatiques (n=6-11/groupe) de troponine Ic et protéine S100β (biomarqueur des lésions neuronales) ont été mesurés à l'aide de deux kits ELISA (Abnova®).

Score de fonction neurologique

L'évaluation neurologique a été réalisée à J1 après l'AC grâce à un score validé dans la littérature.¹⁵ Cette évaluation a été réalisée par un investigateur en aveugle.

Acquisition et analyse des séquences d'IRM

Les images par résonance magnétique ont été acquises à J1 après l'AC dans tous les groupes expérimentaux. Avant la réalisation de l'IRM, les animaux sont anesthésiés par une injection IP de kétamine (50mg/kg, Imalgene®) et de xylazine (2,5 mg/kg, Rompun®). La température de la souris est maintenue à 36,5°C grâce à un circuit thermorégulé intégré dans la table d'IRM. Un capteur des mouvements respiratoires est placé sur l'abdomen (Rapid Biomedical). De l'oxygène est administré devant le museau de la souris. Les acquisitions des séquences d'IRM ont été réalisées in vivo sur un système IRM horizontal 7T BRUKER BioSpec (Bruker Biospin MRI GbmH Bruker).

Le protocole IRM comprend des images transversales pondérées en T2 basées sur la méthode *Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement* (RARE).

La cartographie du coefficient de diffusion apparente (ADC) est basée sur la méthode *Echo Planar Imaging* (EPI). La cartographie paramétrique T2 a été réalisée à l'aide d'une méthode MSMSE (*Multi Slice Multi Echo*). Les cartes ADC ainsi que les cartes paramétriques T2 ont été reconstruites à l'aide du logiciel de post-traitement d'imagerie de BRUKER (ParaVision 5.1). Nous avons par ailleurs développé un score d'intégrité cérébrale simple à utiliser pour interpréter les images pondérées en T2 et la cartographie ADC : une lésion hyper-intense vaut 1 point, 2 lésions hyper-intenses ou plus valent 2 points, les lésions bilatérales hyper-intenses valent 1 point et des lésions sur plus d'une coupe IRM valent 1 point. Les scores ont été réalisés par deux investigateurs en aveugles.

Expérimentations sur les mitochondries

Ces expérimentations ont été réalisées par des investigateurs en aveugle. Les

mitochondries ont été isolées selon un protocole précédemment décrit.^{10,16-19} Le cortex cérébral est prélevé à cœur battant et immédiatement placé dans du tampon A d'isolation froid (saccharose 70 mM, mannitol 210 mM, EDTA 1 mM, EGTA 10 mM et Tris/HCl 50 mM, pH 7,4). Le tissu est ensuite finement ciselé et mélangé dans le même tampon (10 µL de tampon/mg de tissu) dans un homogénéisateur Potter-Elvehjem. L'homogénat est centrifugé à 1300 g pendant 3 minutes. Le surnageant est conservé après avoir été filtré sur une compresse et centrifugé pendant 10 minutes à 10000 g pour le cœur et 5500 g pour le cerveau. Le culot mitochondrial est remis en suspension et homogénéisé dans le même tampon sans agent chélateur de calcium (tampon B). La concentration en protéines est déterminée en utilisant la méthode de Bradford. La capacité de rétention du calcium (CRC), définie comme la quantité de calcium nécessaire pour déclencher une libération massive in vitro de Ca^{2+} , est utilisée comme indicateur de la susceptibilité à l'ouverture du PTP. Les mitochondries isolées (250 µg de protéine cardiaque, 500 µg de protéine cérébrale) sont mises en suspension dans 2 mL de tampon C (saccharose 150 mM, KCl 50 mM, KH_2PO_4 2 mM, succinate 5 mM et 0,5 µM de calcium 5N vert et 5 mM de Tris/HCl, pH 7,4). La préparation est mélangée doucement pendant 2 minutes à 25°C. La mesure de la CRC est effectuée à 25°C en utilisant un spectrofluoromètre Hitachi F2500 (avec des longueurs d'onde d'excitation à 500 nm et d'émission à 530 nm). Des injections de CaCl_2 de 10 nmol ont été effectuées toutes les minutes. Dans un second temps, les mitochondries ont également été exposées à 1 µM de ciclosporine A (CsA) avant les injections de calcium. La CRC est exprimée en nmoles de CaCl_2 par milligramme de protéines.

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard ou en nombre

(pourcentage). L'analyse des résultats a été faite avec le logiciel Graphpad Prism 6 (Logiciel GraphPad). Les comparaisons des variables catégorielles ont été effectuées à l'aide d'un test du chi-2 ou un test exact de Fisher selon le cas échéant. La normalité des valeurs continues a été évaluée à l'aide du test de Kolmogorov-Smirnov. Les valeurs continues ont été comparées, selon le cas échéant, en utilisant une ANOVA à une voie ou un test de Kruskal-Wallis. Les comparaisons entre les variables temporelles au sein de chaque groupe ont été effectuées avec une ANOVA à mesures répétées. L'analyse de Kaplan–Meier et le test du log-rank ont été utilisés pour calculer et comparer les taux de survie. La significativité est retenue lorsque $p < 0,05$.

Résultats

Au total, 156 souris ont été utilisées dans cette étude. 12 animaux ont été exclus avant la randomisation (échec de la chirurgie pour 10 d'entre eux, défaillance du respirateur et extubation accidentelle pour 2 d'entre eux). Les résultats obtenus à partir des 148 souris restantes sont présentés. Dans le premier groupe d'expérimentation (protocole1), 60 souris ont été randomisées (CTRL : n=24, HT : n=15, CypD^{-/-} : n=11, HT + CypD^{-/-} : n=10) et 88 ont été randomisées dans le second groupe d'expérimentation (protocole 2) (CTRL : n=30, HT : n=23, CypD^{-/-} : n=20, HT+CypD^{-/-} : n=15).

Réanimation cardiopulmonaire

Les données de RCP sont présentées dans le tableau 1 et comprennent les données issues des protocoles 1 et 2. Comme attendu, la durée d'asphyxie avant l'AC n'était pas différente entre les groupes. Les animaux des groupes CypD^{-/-} et HT+CypD^{-/-} nécessitaient un massage cardiaque de durée plus courte pour obtenir une RACS que ceux du groupe CTRL (p<0,005). Conformément aux méthodes décrites précédemment, les doses d'adrénaline étaient identiques entre les groupes (données non montrées). Le taux de RACS était de 97% dans le groupe CypD^{-/-} et 100% dans le groupe HT+CypD^{-/-} contre 72% dans le groupe CTRL (p<0,005). Le taux de RACS n'était pas significativement plus élevé chez les souris traitées par hypothermie par rapport aux animaux du groupe CTRL (p=ns).

Table 1 - Cardiopulmonary resuscitation

	Asphyxia before cardiac arrest (s)	Heart massage before ROSC (s)	ROSC
CTRL	99 ± 2	122 ± 9	39/54 (72)
HT	98 ± 2	113 ± 7	30/38 (79)
CypD^{-/-}	92 ± 2	78 ± 4*†	30/31 (97)*
HT+CypD^{-/-}	95 ± 5	82 ± 4*†	25/25 (100)*†

Data are expressed as mean ± SEM or n (%) as appropriate.
 ROSC: Restoration of spontaneous circulation; CTRL: Controls;
 CypD^{-/-}: Cyclophilin D knockout; HT: therapeutic hypothermia
 * $p < 0.05$ vs. CTRL, † $p < 0.05$ vs. HT.

Capacité de rétention calcique

Comme attendu, l'AC entraînait une diminution significative de la CRC dans le cœur et le cerveau par rapport aux animaux Sham ($p < 0,05$) (figure 2). L'hypothermie limitait significativement la susceptibilité d'ouverture du PTP après AC dans les mitochondries isolées du cerveau (augmentation de la quantité de Ca^{2+} nécessaire pour déclencher l'ouverture du PTP) ($p < 0,05$ vs. CTRL). Les souris déficientes en CypD présentaient une CRC significativement plus élevée dans les mitochondries des deux organes par rapport aux animaux contrôles ($p < 0,0001$) ainsi qu'aux animaux du groupe HT ($p < 0,01$). Dans les mitochondries du cerveau et du myocarde de tous les groupes expérimentaux, la CRC était corrigée à une valeur proche des animaux Sham après une exposition *in vitro* à 1 μ M de CsA ($p = ns$ vs. SHAM).

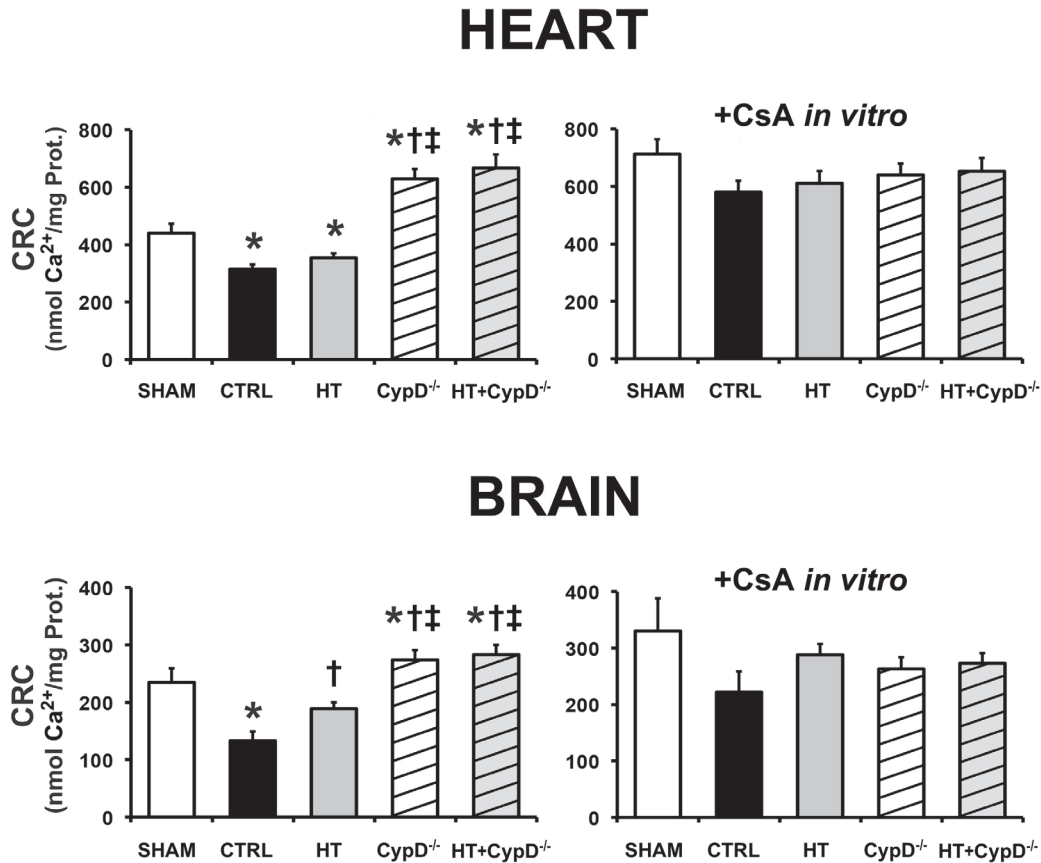


Figure 2 - Calcium retention capacity

Cardiac arrest resulted in a significant decreased in Calcium Retention Capacity (CRC) in mitochondria isolated from the heart and the brain of controls (CTRL). Hypothermia (HT) prevented the susceptibility of PTP opening in mitochondria isolated from brain. Genetic loss of CypD (CypD^{-/-}) resulted in a significant increase in CRC in both organs. In vitro adjunction of CsA significantly increased the amount of Ca²⁺ required to open the PTP in wild type animals (SHAM, CTRL and HT).

Atteinte cardiaque

L'AC entraînant une augmentation significative du taux de troponine dans le sérum ($2,7 \pm 6,5 \mu\text{g/l}$ dans le groupe CTRL vs. $0,1 \pm 0,0 \mu\text{g/l}$ dans le groupe SHAM, $p < 0,001$).

L'hypothermie ainsi que l'absence de CypD limitaient de manière significative l'augmentation du taux de troponine par rapport aux animaux du groupe CTRL ($p < 0,05$) (figure 3).

La fonction systolique ventriculaire gauche, évaluée par la mesure de la fraction de raccourcissement de la surface (FRS), ne différait pas entre les groupes avant AC

(figure 3). Après 150 minutes de reperfusion, la FRS était significativement altérée dans le groupe CTRL par rapport au groupe SHAM ($28 \pm 4\%$ vs. $53 \pm 1\%$, $p < 0,001$). L'hypothermie ainsi que l'absence de CypD permettaient de préserver la FRS après AC en comparaison aux animaux du groupe CTRL ($p < 0,05$).

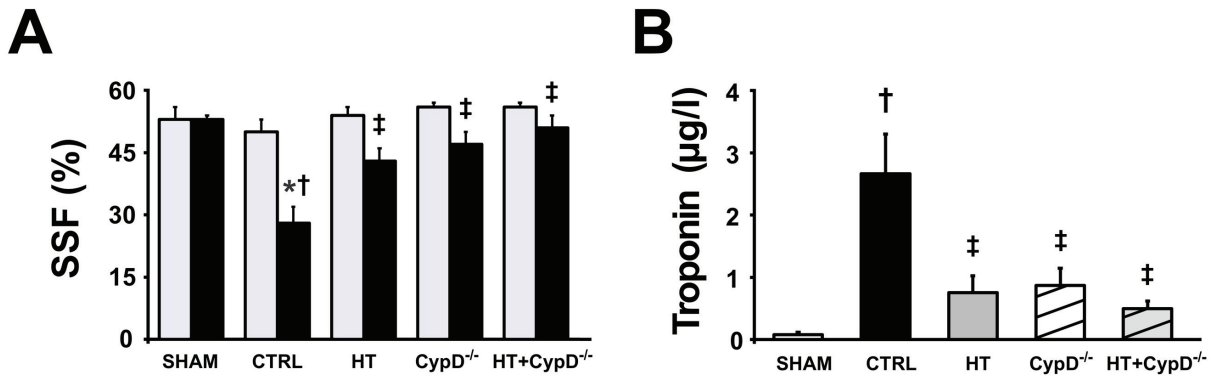


Figure 3 Myocardial injury (n=4-11/group)

A Cardiac arrest led to significant left ventricular failure as assessed by the echocardiographic measurements of the surface shortening fraction (SSF). Both hypothermia (HT) and genetic loss of cyclophilin D (CypD^{-/-}) preserved the myocardial function compared to controls (CTRL). **B** Cardiac arrest resulted in a significant increase in level of serum troponin I compared to the sham animals. Hypothermia (HT) as well as genetic loss of CypD (CypD^{-/-}) prevented myocardial injury compared to the controls (CTRL).

* $p < 0.05$ vs. baseline; † $p < 0.05$ vs. SHAM; ‡ $p < 0.05$ vs. CTRL.

Atteinte neurologique

Comme le montre la figure 4A, les taux plasmatiques de protéine S100β étaient significativement augmentées dans le groupe CTRL (133 ± 28 pg/ml) par rapport au groupe SHAM (20 ± 1 pg/ml) ($p < 0,001$). Les souris hypothermes et CypD^{-/-} présentaient une augmentation significativement moindre des taux plasmatiques de S100β par rapport aux souris contrôles ($p < 0,05$).

Comme le montre la figure 4B, Les groupes HT et CypD^{-/-} présentaient à J1 après l'AC un état neurologique significativement meilleur par rapport aux souris du groupe CTRL ($p < 0,05$). L'utilisation de l'hypothermie sur des souris déficientes en CypD conduisait à des scores de fonction neurologique supérieurs à ceux des autres groupes

expérimentaux ($p < 0,01$).

La figure 4C présente des exemples de séquences IRM T2 et ADC. L'AC entraînait un œdème cérébral visualisé sur les images hyperintenses des séquences pondérées en T2 et en rouge sur les séquences d'ADC chez les animaux contrôles.

Sur la figure 4D représentant les résultats des scores d'intégrité cérébrale après analyse des séquences d'IRM, l'association hypothermie et déficience en CypD entraînait des scores significativement meilleurs que ceux des animaux du groupe CTRL ($p < 0,05$). Aucun signal IRM cérébral pathologique n'a été visualisé dans le groupe HT+CypD^{-/-}.

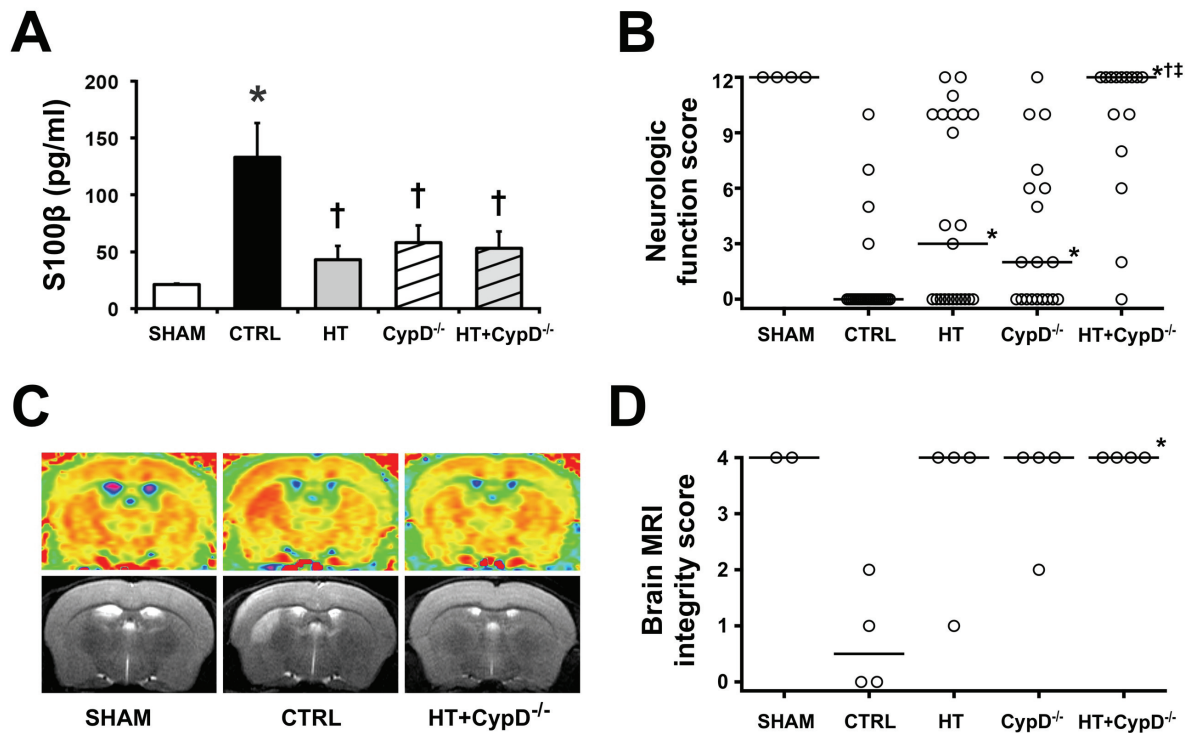


Figure 4 - Neurological assessment

A (n=6-11/group) As assessed by increase in level of serum S100β protein in controls (CTRL), CA led to significant brain damage compared to sham animals. S100β protein release was significantly reduced by hypothermia (HT) and genetic loss of CypD (CypD^{-/-}) compared to controls (CTRL).

B (n=15-30/group) Each circle represents an individual animal scored and thick line the median value of the corresponding group. Neurological dysfunction was significantly attenuated in the hypothermia-treated (HT) and CypD deficient (CypD^{-/-}) mice compared to controls (CTRL). Hypothermia applied on CypD knock-out mice (HT+CypD^{-/-}) led to the best neurological scores compared to all other groups.

C Representatives T2-weighted images (on the bottom) and ADC images (on the top) acquired at day one after CA in sham-operated (SHAM), control (CTRL) and hypothermia-treated CypD deficient (HT+CypD^{-/-}) mice. Arrows indicate areas of lesions.

D Each circle represents an individual animal scored and thick line the median value of the corresponding group. Hypothermia (HT) as well as genetic loss of CypD (CypD^{-/-}) tended to limit brain MRI injuries compared to controls. Brain MRI integrity score was significantly improved in hypothermia+CypD^{-/-} (HT+CypD^{-/-}) mice compared to controls.

* p<0.05 vs CTRL; † p<0.05 vs HT; ‡ p<0.05 vs CypD^{-/-}.

Survie à long terme

La probabilité de survie après AC des quatre groupes expérimentaux est représentée sur la figure 5. Bien que seulement 2 animaux sur 30 (7%) aient survécu 7 jours après l'AC dans le groupe CTRL, 4/20 (20%) ont survécu dans le groupe CypD^{-/-}, 10/23 (43%) dans le groupe HT et 11/15 (73%) dans le groupe HT+CypD^{-/-}. Par ailleurs, la probabilité de survie était significativement plus élevée dans le groupe HT+CypD^{-/-} en comparaison au groupe HT ($p < 0,05$) et au groupe CypD^{-/-} ($p < 0,01$).

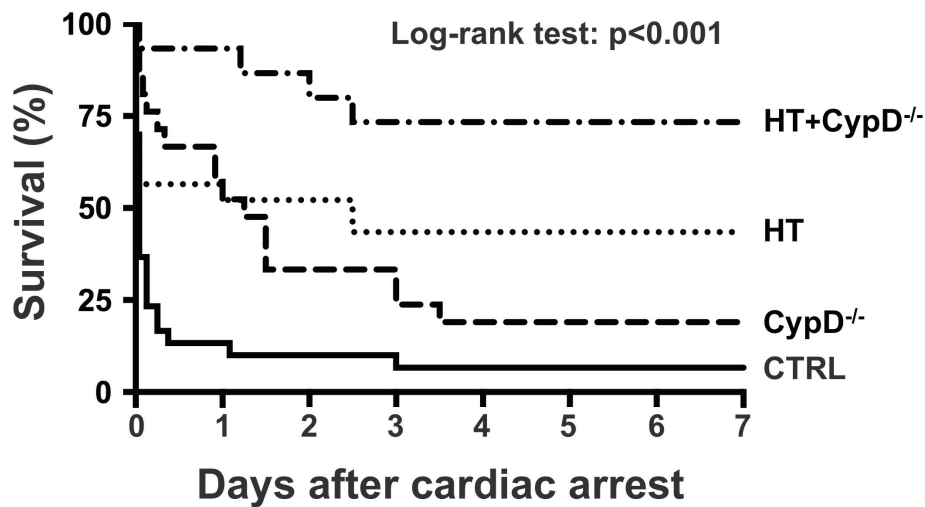


Figure 5 - Survival after cardiac arrest

Kaplan-Meier survival plot in the four experimental group submitted to 5 minutes of asphyxia cardiac arrest (n=15-30/group). The 7-days mortality differed significantly among the 4 groups. CTRL indicates controls animals; HT, hypothermia-treated animals; CypD^{-/-}, CypD knock out mice; HT+CypD^{-/-}, hypothermia-treated CypD^{-/-} mice.

Synthèse des résultats et discussion

Notre étude a permis de montrer que l'absence de CypD associée à l'hypothermie thérapeutique limitait les lésions myocardiques et cérébrales. Par ailleurs, l'inhibition complète du mécanisme CypD-dépendant d'ouverture du PTP permettait, dans notre modèle expérimental, d'améliorer l'efficacité de l'hypothermie sur le succès de la réanimation initiale et la survie à long terme après AC.

L'hypothermie thérapeutique est le seul traitement adjuvant de la réanimation cardio-pulmonaire qui a démontré une amélioration significative du pronostic neurologique et de la survie après AC.^{1,2} L'hypothermie, qui fait partie des traitements recommandés dans la prise en charge des patients en réanimation victimes d'un AC,³ est désormais largement utilisée.^{20,21} Néanmoins, le pronostic après un AC reste particulièrement sombre notamment chez les patients ayant présentés un rythme non choquable avec une probabilité de survie inférieure à 10% à la sortie de l'hôpital.^{4,22}

Notre équipe, parmi d'autres, a montré que l'hypothermie était capable d'inhiber l'ouverture à reperfusion du PTP par un mécanisme dépendant de la CypD, limitant ainsi les lésions de reperfusion.^{7,10} En effet, l'ouverture du PTP est déclenchée par la fixation de la CypD à l'un de ses composants, conséquence d'une production importante de radicaux libres de l'oxygène et d'une surcharge calcique observées à la reperfusion.^{6,11,12,23} L'ouverture du PTP provoque l'entrée d'eau et d'électrolytes dans la mitochondrie entraînant son gonflement, un arrêt du fonctionnement de la chaîne respiratoire et la libération depuis l'espace intermembranaire de facteurs pouvant déclencher la mort cellulaire.^{11,12} Néanmoins, cette inhibition du PTP par l'hypothermie n'est que partielle,^{10,24} ce que confirme notre étude avec une CRC plus importante chez les animaux CypD^{-/-} que chez les animaux du groupe HT. Ces résultats vont dans

le sens de la multiplicité des effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique qui ne se limitent pas à la CypD. Ses mécanismes d'actions nombreux passent également par des effets sur le métabolisme, sur les voies de protection cellulaire ou encore sur l'inflammation.²⁵⁻²⁸

A notre connaissance, il s'agit du premier modèle d'AC par rythme non choquable chez la souris.²⁹ De précédentes équipes ont mis au point des modèles murin d'AC par injection de potassium ou stimulation électrique entraînant une fibrillation ventriculaire.^{15,30,31} Nous avons décidé de mettre au point ce modèle d'AC par rythme non choquable en raison de sa plus grande pertinence clinique puisque les AC par asystole et rythme sans pouls correspondent aux présentations d'AC les plus fréquentes et dont le pronostic est le plus péjoratif.¹⁴ De plus, le potassium est connu pour avoir des effets cardio et neuroprotecteurs dans les phénomènes d'I/R ce qui introduit un important biais potentiel.^{32,33} L'utilisation de l'inhibiteur pharmacologique de référence du PTP, la CsA, n'était pas pertinente du fait de ses nombreuses limites. En effet, les résultats de l'étude CYRUS font craindre que les effets de la CsA sur d'autres cibles que le PTP compromettent son efficacité.²⁰ Par ailleurs, les souris CypD^{-/-} ont montré, *in vitro*, une inhibition d'ouverture du PTP plus marquée que celle offerte par l'injection de CsA.³⁴

Une durée d'AC avant réanimation de 5 minutes a été retenue à l'issue de la phase de mise au point car elle permettait d'obtenir un taux de RACS suffisant dans le groupe contrôle tout en induisant des lésions cardiaques et cérébrales significatives. Cette durée d'ischémie plus courte que celles rapportées dans les autres modèles de la littérature peut s'expliquer par une période d'hypoxie précédant l'AC qui aggrave les lésions cellulaires.^{15,30,31} De façon intéressante, nous avons observé des durées de

massage cardiaque avant RACS et des taux de RACS des groupes CypD^{-/-} et HT+ CypD^{-/-} significativement meilleurs que ceux du groupe HT seuls.

Notre modèle d'AC utilisant des animaux CypD^{-/-} avait donc pour but d'adjoindre à l'hypothermie une inhibition complète de la fixation de la CypD au PTP et d'en observer les effets protecteurs sur le court et le long terme. Nous avons observé, de façon similaire aux résultats expérimentaux précédents, les effets cardio et neuroprotecteurs de l'hypothermie que ce à partir des biomarqueurs des lésions myocardiques et cérébrales ou de l'évaluation des fonctions cardiaque et neurologique.^{8,15,24,35} Par ailleurs, c'est la première fois qu'une étude expérimentale rapporte les résultats d'IRM cérébrales chez la souris après un AC asphyxique. Les lésions observées se situaient principalement dans le cortex et l'hippocampe. Afin de s'assurer que les lésions ne pouvaient pas s'expliquer par la ligature de la veine jugulaire interne gauche après l'ablation du cathéter, nous avons réalisé des IRM sur des souris après ligatures de la veine jugulaire interne droite ou gauche et nous n'avons constaté aucune lésion à l'IRM.

A notre connaissance, très peu d'études ont publié des données sur la neuroprotection apportée par la suppression de la CypD. Dans un modèle d'ischémie par ligature de l'artère cérébrale moyenne, Schinzel *et al.* ont montré que les souris CypD^{-/-} présentaient une taille réduite d'infarctus de plus de 60% à 24 heures de reperfusion.¹³ Par ailleurs, nous avons observé une cardioprotection chez les souris CypD^{-/-} à la reperfusion en accord avec les données de la littérature dans d'autres modèle d'I/R myocardique.^{11,36-38} Les effets protecteurs observés chez les souris CypD^{-/-} semblent en revanche insuffisant à distance de l'AC avec une défaillance neurologique importante à J1 et un taux de survie faible à J7. En revanche, les souris qui associaient hypothermie thérapeutique et déficience en CypD présentaient un meilleur examen

neurologique à long terme que tous les autres groupes ainsi que la meilleure survie à J7. Nous avons également observé un excellent taux de survie (>90%) dans les deux premières heures suivant la reperfusion chez les souris CypD^{-/-} notamment grâce à un taux de RACS élevé. Ces animaux présentaient ensuite une mortalité qui s'aggravait rapidement pour se rapprocher de celle des souris contrôles à J7. A l'inverse, les souris hypothermes présentaient une mortalité à 150 minutes de reperfusion d'environ 30% avec un taux de RACS plus faible que les CypD^{-/-}. Ce taux se stabilisait ensuite jusqu'à J7. Ainsi, il semble que l'association HT+CypD^{-/-} permet de combiner les effets protecteurs très immédiats de l'inhibition complète de la fixation de la CypD au PTP aux effets sur le long terme de l'hypothermie thérapeutique.

Nos résultats issus du premier modèle d'AC asphyxique chez la souris suggèrent que la CypD reste une cible potentielle pour augmenter le succès de la réanimation initiale améliorant ainsi l'efficacité de l'hypothermie thérapeutique sur la survie à long terme. La poursuite des recherches sur les moyens d'inhiber l'ouverture du PTP en association à l'hypothermie est nécessaire pour développer des thérapeutiques susceptibles d'améliorer le pronostic des patients victimes d'un AC.

Références bibliographiques

1. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;346:557–563.
2. 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.
3. Donnino MW, Andersen LW, Berg KM, Reynolds JC, Nolan JP, Morley PT, Lang E, Cocchi MN, Xanthos T, Callaway CW, Soar J, ILCOR ALS Task Force. Temperature Management After Cardiac Arrest: An Advisory Statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Circulation*. 2015;132:2448–2456.
4. Gräsner J-T, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Böttiger BW, Herlitz J, Wnent J, Tjelmeland IBM, Ortiz FR, Maurer H, Baubin M, Mols P, Hadžibegović I, Ioannides M, Škulec R, Wissenberg M, Salo A, Hubert H, Nikolaou NI, Lóczi G, Svavarsdóttir H, Semeraro F, Wright PJ, Clarens C, Pijls R, Cebula G, Correia VG, Cimpoesu D, Raffay V, Trenkler S, Markota A, Strömsöe A, Burkart R, Perkins GD, Bossaert LL, EuReCa ONE Collaborators. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188–195.
5. Neumar Robert W., Nolan Jerry P., Adrie Christophe, Aibiki Mayuki, Berg Robert A., Böttiger Bernd W., Callaway Clifton, Clark Robert S.B., Geocadin Romergryko G., Jauch Edward C., Kern Karl B., Laurent Ivan, Longstreth W.T., Merchant Raina M., Morley Peter, Morrison Laurie J., Nadkarni Vinay, Peberdy Mary Ann, Rivers Emanuel P., Rodriguez-Nunez Antonio, Sellke Frank W., Spaulding Christian, Sunde Kjetil, Vanden Hoek Terry. Post-Cardiac Arrest Syndrome. *Circulation*. 2008;118:2452–2483.
6. Patil KD, Halperin HR, Becker LB. Cardiac arrest: resuscitation and reperfusion. *Circ Res*. 2015;116:2041–2049.
7. Gong P, Hua R, Zhang Y, Zhao H, Tang Z, Mei X, Zhang M, Cui J, Li C. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:928–934.
8. Huang C-H, Tsai M-S, Chiang C-Y, Su Y-J, Wang T-D, Chang W-T, Chen H-W, Chen W-J. Activation of mitochondrial STAT-3 and reduced mitochondria damage during hypothermia treatment for post-cardiac arrest myocardial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:59.

9. Liu J, Wang Y, Zhuang Q, Chen M, Wang Y, Hou L, Han F. Protective effects of cyclosporine A and hypothermia on neuronal mitochondria in a rat asphyxial cardiac arrest model. *Am J Emerg Med.* 2016;34:1080–1085.
10. Jahandiez V, Cour M, Bochaton T, Abrial M, Loufouat J, Gharib A, Varennes A, Ovize M, Argaud L. Fast therapeutic hypothermia prevents post-cardiac arrest syndrome through cyclophilin D-mediated mitochondrial permeability transition inhibition. *Basic Res Cardiol.* 2017;112:35.
11. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molckentin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658–662.
12. Alam MR, Baetz D, Ovize M. Cyclophilin D and myocardial ischemia-reperfusion injury: a fresh perspective. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:80–89.
13. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:12005–12010.
14. Mozaffarian Dariush, Benjamin Emelia J., Go Alan S., Arnett Donna K., Blaha Michael J., Cushman Mary, de Ferranti Sarah, Després Jean-Pierre, Fullerton Heather J., Howard Virginia J., Huffman Mark D., Judd Suzanne E., Kissela Brett M., Lackland Daniel T., Lichtman Judith H., Lisabeth Lynda D., Liu Simin, Mackey Rachel H., Matchar David B., McGuire Darren K., Mohler Emile R., Moy Claudia S., Muntner Paul, Mussolino Michael E., Nasir Khurram, Neumar Robert W., Nichol Graham, Palaniappan Latha, Pandey Dilip K., Reeves Mathew J., Rodriguez Carlos J., Sorlie Paul D., Stein Joel, Towfighi Amytis, Turan Tanya N., Virani Salim S., Willey Joshua Z., Woo Daniel, Yeh Robert W., Turner Melanie B. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. *Circulation.* 2015;131:e29–e322.
15. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation.* 2004;109:2786–2791.
16. Kristián T, Gertsch J, Bates TE, Siesjö BK. Characteristics of the calcium-triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effect of cyclosporin A and ubiquinone O. *J Neurochem.* 2000;74:1999–2009.
17. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005;111:194–197.
18. Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, Argaud L. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117:930–936.

19. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J*. 2011;32:226–235.
20. Argaud L, Cour M, Dubien P-Y, Giraud F, Jossan C, Riche B, Hernu R, Darmon M, Poncelin Y, Tchénio X, Quenot J-P, Freysz M, Kamga C, Beuret P, Usseglio P, Badet M, Anette B, Chaulier K, Alasan E, Sadoune S, Bobbia X, Zéni F, Gueugniaud P-Y, Robert D, Roy P, Ovize M, CYRUS Study Group. Effect of Cyclosporine in Nonshockable Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The CYRUS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol*. 2016;1:557–565.
21. Bradley SM, Liu W, McNally B, Vellano K, Henry TD, Mooney MR, Burke MN, Brilakis ES, Grunwald GK, Adhaduk M, Donnino M, Girotra S, Cardiac Arrest Registry to Enhance Survival (CARES) Surveillance Group. Temporal Trends in the Use of Therapeutic Hypothermia for Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *JAMA Netw Open*. 2018;1:e184511.
22. Girotra S, Nallamothu BK, Spertus JA, Li Y, Krumholz HM, Chan PS. Trends in Survival after In-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med*. 2012;367:1912–1920.
23. Giorgio V, Guo L, Bassot C, Petronilli V, Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*. 2018;70:56–63.
24. Jahandiez V, Cour M, Abrial M, Loufouat J, Ovize M, Argaud L. Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest: Involvement of the Risk Pathway in Mitochondrial PTP-Mediated Neuroprotection. *Shock*. 2019;52:224–229.
25. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med*. 2009;37:S186-202.
26. Moore EM, Nichol AD, Bernard SA, Bellomo R. Therapeutic hypothermia: benefits, mechanisms and potential clinical applications in neurological, cardiac and kidney injury. *Injury*. 2011;42:843–854.
27. Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res*. 2012;94:217–225.
28. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:267–278.
29. Vognsen M, Fabian-Jessing BK, Secher N, Løfgren B, Dezfulian C, Andersen LW, Granfeldt A. Contemporary animal models of cardiac arrest: A systematic review. *Resuscitation*. 2017;113:115–123.
30. Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods*. 2004;136:33–44.

31. Böttiger BW, Teschendorf P, Krumnikl JJ, Vogel P, Galmbacher R, Schmitz B, Motsch J, Martin E, Gass P. Global cerebral ischemia due to cardiocirculatory arrest in mice causes neuronal degeneration and early induction of transcription factor genes in the hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res*. 1999;65:135–142.
32. Yamamoto H, Magishi K, Goh K, Sasajima T, Yamamoto F. Cardioprotective effects of normothermic reperfusion with oxygenated potassium cardioplegia: a possible mechanism. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2009;9:598–604.
33. Tan X-F, Qin T, Li N, Yang Y-G, Zheng J-H, Xie L, Chen M-H. High-potassium preconditioning enhances tolerance to focal cerebral ischemia-reperfusion injury through anti-apoptotic effects in male rats. *J Neurosci Res*. 2019;97:1253–1265.
34. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*. 2005;280:18558–18561.
35. Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleh B, Zini R, Dubois-Randé J-L, Carli P, Vivien B, Ricard J-D, Berdeaux A, Tissier R. Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in rabbits. *Circulation*. 2011;124:901–911.
36. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005;434:652–658.
37. Belaidi E, Decorps J, Augeul L, Durand A, Ovize M. Endoplasmic reticulum stress contributes to heart protection induced by cyclophilin D inhibition. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:363.
38. Teixeira G, Chiari P, Fauconnier J, Abrial M, Couture-Lepetit E, Harisseh R, Pillot B, Lacampagne A, Tourneur Y, Gharib A, Ovize M. Involvement of Cyclophilin D and Calcium in Isoflurane-induced Preconditioning. *Anesthesiology*. 2015;123:1374–1384.

CONCLUSION

L'arrêt cardiaque est un problème majeur de santé publique dont la mortalité reste très élevée malgré les progrès de la réanimation. La majorité des décès survenant chez les patients réanimés avec succès est la conséquence du syndrome post-arrêt cardiaque dont les atteintes cardio-vasculaire et neurologique sont les deux composantes principales. L'arrêt cardiaque est une modalité particulièrement sévère d'ischémie-reperfusion puisqu'elle concerne tous les organes. La souffrance des organes est non seulement la conséquence de l'anoxie cellulaire secondaire à l'ischémie mais aussi celle de la reperfusion lors de la restauration d'une activité circulatoire efficace. En effet, la reperfusion entraîne l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial, un canal situé dans la membrane interne de la mitochondrie, à l'origine de lésions cellulaires importantes pouvant conduire à la mort de la cellule. La cyclophiline D joue un rôle majeur car sa fixation au pore de transition déclenche l'ouverture de celui-ci. L'hypothermie thérapeutique est le seul traitement adjuvant de la réanimation cardio-pulmonaire qui a démontré un bénéfice sur la survie et le pronostic neurologique des patients en limitant le syndrome post-arrêt cardiaque. Ses mécanismes d'action nombreux et complexes ne sont que partiellement compris. Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé notre modèle d'arrêt cardiaque chez le lapin pour étudier les mécanismes mitochondriaux des effets protecteurs de l'hypothermie thérapeutique. Notre modèle a permis de mettre en évidence le rôle majeur joué par la température dans la gravité du syndrome post-arrêt cardiaque. Nos résultats montrent, sur un modèle d'arrêt cardiaque avec rythme non choquable, que l'hypothermie thérapeutique a des effets protecteurs sur le cœur et le cerveau. Ces effets ont pour mécanisme une inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial et une préservation de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'association à l'inhibition pharmacologique de la fixation de la cyclophiline D au pore de transition n'entraîne pas d'effet protecteur additif, suggérant des mécanismes d'action commun. La modification de l'acétylation de la cyclophiline D et l'activation de la voie de signalisation cellulaire RISK pourraient être des mécanismes d'action importants de l'hypothermie. Pour mieux décrire le rôle de la cyclophiline D, nous avons mis au point un modèle d'arrêt cardiaque par rythme non choquable chez la souris. Nos résultats montrent l'inhibition complète du mécanisme CypD-dépendant d'ouverture du PTP grâce à des animaux déficients en cyclophiline D améliore le succès de la réanimation cardio-pulmonaire ainsi que la survie à long terme

des animaux traités par hypothermie thérapeutique. Notre nouveau modèle d'arrêt cardiaque chez la souris permet de poursuivre les investigations sur les mécanismes protecteurs de l'hypothermie thérapeutique et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Ainsi, nos travaux contribuent à déterminer les mécanismes d'action mitochondriaux de l'hypothermie thérapeutique et à identifier des pistes thérapeutiques pour améliorer le pronostic des patients après un arrêt cardiaque réanimé.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Mozaffarian Dariush, Benjamin Emelia J., Go Alan S., Arnett Donna K., Blaha Michael J., Cushman Mary, de Ferranti Sarah, Després Jean-Pierre, Fullerton Heather J., Howard Virginia J., Huffman Mark D., Judd Suzanne E., Kissela Brett M., Lackland Daniel T., Lichtman Judith H., Lisabeth Lynda D., Liu Simin, Mackey Rachel H., Matchar David B., McGuire Darren K., Mohler Emile R., Moy Claudia S., Muntner Paul, Mussolino Michael E., Nasir Khurram, Neumar Robert W., Nichol Graham, Palaniappan Latha, Pandey Dilip K., Reeves Mathew J., Rodriguez Carlos J., Sorlie Paul D., Stein Joel, Towfighi Amytis, Turan Tanya N., Virani Salim S., Willey Joshua Z., Woo Daniel, Yeh Robert W., Turner Melanie B. Heart Disease and Stroke Statistics—2015 Update. *Circulation*. 2015;131:e29–e322.
2. Atwood C, Eisenberg MS, Herlitz J, Rea TD. Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe. *Resuscitation*. 2005;67:75–80.
3. Gräsner J-T, Lefering R, Koster RW, Masterson S, Böttiger BW, Herlitz J, Wnent J, Tjelmeland IBM, Ortiz FR, Maurer H, Baubin M, Mols P, Hadžibegović I, Ioannides M, Škulec R, Wissenberg M, Salo A, Hubert H, Nikolaou NI, Lóczi G, Svavarsdóttir H, Semeraro F, Wright PJ, Clarens C, Pijls R, Cebula G, Correia VG, Cimpoesu D, Raffay V, Trenkler S, Markota A, Strömsöe A, Burkart R, Perkins GD, Bossaert LL, EuReCa ONE Collaborators. EuReCa ONE-27 Nations, ONE Europe, ONE Registry: A prospective one month analysis of out-of-hospital cardiac arrest outcomes in 27 countries in Europe. *Resuscitation*. 2016;105:188–195.
4. Girotra S, Nallamothu BK, Spertus JA, Li Y, Krumholz HM, Chan PS. Trends in Survival after In-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med*. 2012;367:1912–1920.
5. Negovsky VA. The second step in resuscitation--the treatment of the "post-resuscitation disease." *Resuscitation*. 1972;1:1–7.
6. Neumar Robert W., Nolan Jerry P., Adrie Christophe, Aibiki Mayuki, Berg Robert A., Böttiger Bernd W., Callaway Clifton, Clark Robert S.B., Geocadin Romergryko G., Jauch Edward C., Kern Karl B., Laurent Ivan, Longstreth W.T., Merchant Rivers Emanuel P., Rodriguez-Nunez Antonio, Sellke Frank W., Spaulding Christian, Sunde Kjetil, Vanden Hoek Terry. Post-Cardiac Arrest Syndrome. *Circulation*. 2008;118:2452–2483.
7. Lemiale V, Dumas F, Mongardon N, Giovanetti O, Charpentier J, Chiche J-D, Carli P, Mira J-P, Nolan J, Cariou A. 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.
8. Dragancea I, Rundgren M, Englund E, Friberg H, Cronberg T. The influence of induced hypothermia and delayed prognostication on the mode of death after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2013;84:337–342.

9. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes J, Kjaergaard J, Kuiper M, Pellis T, Stammet P, Wanscher M, Wise MP, Åneman A, Al-Subaie N, Boesgaard S, Bro-Jeppesen J, Brunetti I, Bugge JF, Hingston CD, Juffermans NP, Koopmans M, Køber L, Langørgen J, Lilja G, Møller JE, Rundgren M, Rylander C, Smid O, Werer C, Winkel P, Friberg H. Targeted Temperature Management at 33°C versus 36°C after Cardiac Arrest. *N Engl J Med.* 2013;369:2197–2206.
10. Laver S, Farrow C, Turner D, Nolan J. Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest. *Intensive Care Med.* 2004;30:2126–2128.
11. G. Geri, A. Cariou. Syndrome post-arrêt cardiaque. *Méd Intensive Réa.* 2016;25:464–474.
12. Neumar RW. Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury. *Ann Emerg Med.* 2000;36:483–506.
13. Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE. Clinical pathophysiology of hypoxic ischemic brain injury after cardiac arrest: a “two-hit” model. *Crit Care.* 2017;21:90.
14. Cui D, Shang H, Zhang X, Jiang W, Jia X. Cardiac arrest triggers hippocampal neuronal death through autophagic and apoptotic pathways. *Sci Rep.* 2016;6:27642.
15. Lemiale V, Huet O, Vigué B, Mathonnet A, Spaulding C, Mira J-P, Carli P, Duranteau J, Cariou A. Changes in cerebral blood flow and oxygen extraction during post-resuscitation syndrome. *Resuscitation.* 2008;76:17–24.
16. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, Schörkhuber W, Eisenburger P, Havel C, Kliegel A, Laggner AN. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Arch Intern Med.* 2001;161:2007–2012.
17. Gebhardt K, Guyette FX, Doshi AA, Callaway CW, Rittenberger JC, Post Cardiac Arrest Service. Prevalence and effect of fever on outcome following resuscitation from cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013;84:1062–1067.
18. Bro-Jeppesen J, Hassager C, Wanscher M, Søholm H, Thomsen JH, Lippert FK, Møller JE, Køber L, Kjaergaard J. Post-hypothermia fever is associated with increased mortality after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013;84:1734–1740.
19. Leary M, Grossestreuer AV, Iannaccone S, Gonzalez M, Shofer FS, Povey C, Wendell G, Archer SE, Gaieski DF, Abella BS. Pyrexia and neurologic outcomes after therapeutic hypothermia for cardiac arrest. *Resuscitation.* 2013;84:1056–1061.

20. Beiser DG, Carr GE, Edelson DP, Peberdy MA, Hoek TLV. Derangements in blood glucose following initial resuscitation from in-hospital cardiac arrest: a report from the national registry of cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2009;80:624–630.
21. Nurmi J, Boyd J, Anttalainen N, Westerbacka J, Kuisma M. Early Increase in Blood Glucose in Patients Resuscitated From Out-of-Hospital Ventricular Fibrillation Predicts Poor Outcome. *Diabetes Care*. 2012;35:510–512.
22. Daviaud F, Dumas F, Demars N, Geri G, Bouglé A, Morichau-Beauchant T, Nguyen Y-L, Bougouin W, Pène F, Charpentier J, Cariou A. Blood glucose level and outcome after cardiac arrest: insights from a large registry in the hypothermia era. *Intensive Care Med*. 2014;40:855–862.
23. Perkins GD, Ji C, Deakin CD, Quinn T, Nolan JP, Scomparin C, Regan S, Long J, Slowther A, Pocock H, Black JJM, Moore F, Fothergill RT, Rees N, O’Shea L, Docherty M, Gunson I, Han K, Charlton K, Finn J, Petrou S, Stallard N, Gates S, Lall R, PARAMEDIC2 Collaborators. A Randomized Trial of Epinephrine in Out-of-Hospital Cardiac Arrest. *N Engl J Med*. 2018;379:711–721.
24. Jentzer JC, Chonde MD, Dezfulian C. Myocardial Dysfunction and Shock after Cardiac Arrest. *BioMed Res Int*. 2015;2015:314796.
25. Laurent I, Monchi M, Chiche J-D, Joly L-M, Spaulding C, Bourgeois B, Cariou A, Rozenberg A, Carli P, Weber S, Dhainaut J-F. Reversible myocardial dysfunction in survivors of out-of-hospital cardiac arrest. *J Am Coll Cardiol*. 2002;40:2110–2116.
26. Ruiz-Bailén M, Aguayo de Hoyos E, Ruiz-Navarro S, Díaz-Castellanos MA, Rucabado-Aguilar L, Gómez-Jiménez FJ, Martínez-Escobar S, Moreno RM, Fierro-Rosón J. Reversible myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation*. 2005;66:175–181.
27. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*. 1975;56:978–985.
28. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*. 1982;66:1146–1149.
29. Kern KB, Hilwig RW, Berg RA, Rhee KH, Sanders AB, Otto CW, Ewy GA. Postresuscitation left ventricular systolic and diastolic dysfunction. Treatment with dobutamine. *Circulation*. 1997;95:2610–2613.
30. Vasquez A, Kern KB, Hilwig RW, Heidenreich J, Berg RA, Ewy GA. Optimal dosing of dobutamine for treating post-resuscitation left ventricular dysfunction. *Resuscitation*. 2004;61:199–207.

31. Kern KB, Hilwig RW, Rhee KH, Berg RA. Myocardial dysfunction after resuscitation from cardiac arrest: an example of global myocardial stunning. *J Am Coll Cardiol.* 1996;28:232–240.
32. Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med.* 2007;357:1121–1135.
33. P. Lancellotti, M.L. Moonen. La sidéraion myocardique vue par le réanimateur. *Réanimation. Réanimation.* 2009;18:191–196.
34. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev.* 1999;79:609–634.
35. Wei G-Z, Zhou J-J, Wang B, Wu F, Bi H, Wang Y-M, Yi D-H, Yu S-Q, Pei J-M. Diastolic Ca²⁺ overload caused by Na⁺/Ca²⁺ exchanger during the first minutes of reperfusion results in continued myocardial stunning. *Eur J Pharmacol.* 2007;572:1–11.
36. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaou J-F, Spaulding C. Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome? *Curr Opin Crit Care.* 2004;10:208–212.
37. Mattana J, Singhal PC. Determinants of elevated creatine kinase activity and creatine kinase MB-fraction following cardiopulmonary resuscitation. *Chest.* 1992;101:1386–1392.
38. Smekal D, Johansson J, Huzevka T, Rubertsson S. No difference in autopsy detected injuries in cardiac arrest patients treated with manual chest compressions compared with mechanical compressions with the LUCAS device—a pilot study. *Resuscitation.* 2009;80:1104–1107.
39. Nolan JP, Soar J, Cariou A, Cronberg T, Moulaert VRM, Deakin CD, Bottiger BW, Friberg H, Sunde K, Sandroni C. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine Guidelines for Post-resuscitation Care 2015: Section 5 of the European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015. *Resuscitation.* 2015;95:202–222.
40. Tang W, Weil MH, Sun S, Noc M, Yang L, Gazmuri RJ. Epinephrine increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation.* 1995;92:3089–3093.
41. Fries M, Weil MH, Chang Y-T, Castillo C, Tang W. Microcirculation during cardiac arrest and resuscitation. *Crit Care Med.* 2006;34:S454-457.
42. Ditchey RV, Lindenfeld J. Failure of epinephrine to improve the balance between myocardial oxygen supply and demand during closed-chest resuscitation in dogs. *Circulation.* 1988;78:382–389.
43. Gazmuri RJ. Effects of repetitive electrical shocks on postresuscitation myocardial function. *Crit Care Med.* 2000;28:N228-232.

44. Xie J, Weil MH, Sun S, Tang W, Sato Y, Jin X, Bisera J. High-energy defibrillation increases the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Circulation*. 1997;96:683–688.
45. Caterine MR, Spencer KT, Pagan-Carlo LA, Smith RS, Buettner GR, Kerber RE. Direct current shocks to the heart generate free radicals: an electron paramagnetic resonance study. *J Am Coll Cardiol*. 1996;28:1598–1609.
46. Kamohara T, Weil MH, Tang W, Sun S, Yamaguchi H, Klouche K, Bisera J. A comparison of myocardial function after primary cardiac and primary asphyxial cardiac arrest. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1221–1224.
47. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraise F, Dinh-Xuan AT, Carli P, Spaulding C, Dhainaut J-F, Cavaillon J-M. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a “sepsis-like” syndrome. *Circulation*. 2002;106:562–568.
48. Karimova A, Pinsky DJ. The endothelial response to oxygen deprivation: biology and clinical implications. *Intensive Care Med*. 2001;27:19–31.
49. Cavaillon J-M, Adrie C, Fitting C, Adib-Conquy M. Endotoxin tolerance: is there a clinical relevance? *J Endotoxin Res*. 2003;9:101–107.
50. Venet F, Cour M, Demaret J, Monneret G, Argaud L. Decreased Monocyte HLA-DR Expression in Patients After Non-Shockable out-of-Hospital Cardiac Arrest. *Shock*. 2016;46:33–36.
51. Böttiger BW, Motsch J, Böhrer H, Böker T, Aulmann M, Nawroth PP, Martin E. Activation of blood coagulation after cardiac arrest is not balanced adequately by activation of endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 1995;92:2572–2578.
52. Adrie C, Monchi M, Laurent I, Um S, Yan SB, Thuong M, Cariou A, Charpentier J, Dhainaut JF. Coagulopathy after successful cardiopulmonary resuscitation following cardiac arrest: implication of the protein C anticoagulant pathway. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:21–28.
53. Homer-Vanniasinkam S, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 1997;14:195–203.
54. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med*. 2002;346:557–563.
55. 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.

56. Soar J, Callaway CW, Aibiki M, Böttiger BW, Brooks SC, Deakin CD, Donnino MW, Drajer S, Kloeck W, Morley PT, Morrison LJ, Neumar RW, Nicholson TC, Nolan JP, Okada K, O'Neil BJ, Paiva EF, Parr MJ, Wang T-L, Witt J, Advanced Life Support Chapter Collaborators. Part 4: Advanced life support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment Recommendations. *Resuscitation*. 2015;95:e71-120.
57. Donnino MW, Andersen LW, Berg KM, Reynolds JC, Nolan JP, Morley PT, Lang E, Cocchi MN, Xanthos T, Callaway CW, Soar J, ILCOR ALS Task Force. Temperature Management After Cardiac Arrest: An Advisory Statement by the Advanced Life Support Task Force of the International Liaison Committee on Resuscitation and the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee and the Council on Cardiopulmonary, Critical Care, Perioperative and Resuscitation. *Circulation*. 2015;132:2448–2456.
58. Damian MS, Ellenberg D, Gildemeister R, Lauermann J, Simonis G, Sauter W, Georgi C. Coenzyme Q10 combined with mild hypothermia after cardiac arrest: a preliminary study. *Circulation*. 2004;110:3011–3016.
59. Brain Resuscitation Clinical Trial I Study Group. Randomized clinical study of thiopental loading in comatose survivors of cardiac arrest. *N Engl J Med*. 1986;314:397–403.
60. Mentzelopoulos SD, Zakynthinos SG, Tzoufi M, Katsios N, Papastylianou A, Gkisioti S, Stathopoulos A, Kollintza A, Stamataki E, Roussos C. Vasopressin, epinephrine, and corticosteroids for in-hospital cardiac arrest. *Arch Intern Med*. 2009;169:15–24.
61. Grafton ST, Longstreth WT. Steroids after cardiac arrest: a retrospective study with concurrent, nonrandomized controls. *Neurology*. 1988;38:1315–1316.
62. Gueugniaud PY, Gaussorgues P, Garcia-Darenes F, Bancalari G, Roux H, Robert D, Petit P. Early effects of nimodipine on intracranial and cerebral perfusion pressures in cerebral anoxia after out-of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 1990;20:203–212.
63. Longstreth WT, Fahrenbruch CE, Olsufka M, Walsh TR, Copass MK, Cobb LA. Randomized clinical trial of magnesium, diazepam, or both after out-of-hospital cardiac arrest. *Neurology*. 2002;59:506–514.
64. Cariou A, Deye N, Vivien B, Richard O, Pichon N, Bourg A, Huet L, Buleon C, Frey J, Asfar P, Legriel S, Narcisse S, Mathonnet A, Cravoisy A, Dequin P-F, Wiel E, Razazi K, Daubin C, Kimmoun A, Lamhaut L, Marx J-S, de la Garanderie DP, Ecollan P, Combes A, Spaulding C, Barat F, Ben Boutieb M, Coste J, Chiche J-D, Pène F, Mira J-P, Treluyer J-M, Hermine O, Carli P, Epo-ACR-02 Study Group. Early High-Dose Erythropoietin Therapy After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Multicenter, Randomized Controlled Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68:40–49.

65. Argaud L, Cour M, Dubien P-Y, Giraud F, Jossan C, Riche B, Hernu R, Darmon M, Poncelin Y, Tchénio X, Quenot J-P, Freysz M, Kamga C, Beuret P, Usseglio P, Badet M, Anette B, Chaulier K, Alasan E, Sadoune S, Bobbia X, Zéni F, Gueugniaud P-Y, Robert D, Roy P, Ovize M, CYRUS Study Group. Effect of Cyclosporine in Nonshockable Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The CYRUS Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol.* 2016;1:557–565.
66. Inhaled Nitric Oxide After Out-of-Hospital Cardiac Arrest (iNOOHCA). Available at <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03079102>.
67. Larsen JM, Ravkilde J. Acute coronary angiography in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest—a systematic review and meta-analysis. *Resuscitation.* 2012;83:1427–1433.
68. Nikolaou NI, Arntz H-R, Bellou A, Beygui F, Bossaert LL, Cariou A, Initial management of acute coronary syndromes section Collaborator. European Resuscitation Council Guidelines for Resuscitation 2015 Section 8. Initial management of acute coronary syndromes. *Resuscitation.* 2015;95:264–277.
69. Hollenbeck RD, McPherson JA, Mooney MR, Unger BT, Patel NC, McMullan PW, Hsu C-H, Seder DB, Kern KB. Early cardiac catheterization is associated with improved survival in comatose survivors of cardiac arrest without STEMI. *Resuscitation.* 2014;85:88–95.
70. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Wanscher M, Pedersen F, Holmvang L, Lippert FK, Møller JE, Køber L, Hassager C. Emergency coronary angiography in comatose cardiac arrest patients: do real-life experiences support the guidelines? *Eur Heart J.* 2012;1:291–301.
71. Dankiewicz J, Nielsen N, Annborn M, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Kjaergaard J, Pellis T, Friberg H. Survival in patients without acute ST elevation after cardiac arrest and association with early coronary angiography: a post hoc analysis from the TTM trial. *Intensive Care Med.* 2015;41:856–864.
72. Noc M, Fajadet J, Lassen JF, Kala P, MacCarthy P, Olivecrona GK, Windecker S, Spaulding C, European Association for Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI), Stent for Life (SFL) Group. Invasive coronary treatment strategies for out-of-hospital cardiac arrest: a consensus statement from the European association for percutaneous cardiovascular interventions (EAPCI)/stent for life (SFL) groups. *EuroIntervention.* 2014;10:31–37.
73. Wilson M, Grossestreuer AV, Gaieski DF, Abella BS, Frohna W, Goyal M. Incidence of coronary intervention in cardiac arrest survivors with non-shockable initial rhythms and no evidence of ST-elevation MI (STEMI). *Resuscitation.* 2017;113:83–86.
74. Wang C-H, Chang W-T, Huang C-H, Tsai M-S, Yu P-H, Wang A-Y, Chen N-C, Chen W-J. The effect of hyperoxia on survival following adult cardiac arrest: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Resuscitation.* 2014;85:1142–1148.

75. Lee BK, Jeung KW, Lee HY, Lee SJ, Jung YH, Lee WK, Heo T, Min YI. Association between mean arterial blood gas tension and outcome in cardiac arrest patients treated with therapeutic hypothermia. *Am J Emerg Med.* 2014;32:55–60.
76. Vaahersalo J, Bendel S, Reinikainen M, Kurola J, Tiainen M, Raj R, Pettilä V, Varpula T, Skrifvars MB, FINNRESUSCI Study Group. Arterial blood gas tensions after resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest: associations with long-term neurologic outcome. *Crit Care Med.* 2014;42:1463–1470.
77. Llitjos J-F, Mira J-P, Duranteau J, Cariou A. Hyperoxia toxicity after cardiac arrest: What is the evidence? *Ann Intensive Care.* 2016;6:23.
78. Oksanen T, Skrifvars MB, Varpula T, Kuitunen A, Pettilä V, Nurmi J, Castrén M. Strict versus moderate glucose control after resuscitation from ventricular fibrillation. *Intensive Care Med.* 2007;33:2093–2100.
79. Padkin A. Glucose control after cardiac arrest. *Resuscitation.* 2009;80:611–612.
80. Letts JA, Sazanov LA. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol.* 2017;24:800–808.
81. Finkel T, Menazza S, Holmström KM, Parks RJ, Liu J, Sun J, Liu J, Pan X, Murphy E. The ins and outs of mitochondrial calcium. *Circ Res.* 2015;116:1810–1819.
82. Kamer KJ, Mootha VK. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:545–553.
83. Raaflaub J. [Swelling of isolated mitochondria of the liver and their susceptibility to physicochemical influences]. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1953;11:142–156.
84. Raaflaub J. [Mechanism of adenosinetriphosphate as cofactor of isolated mitochondria]. *Helv Physiol Pharmacol Acta.* 1953;11:157–165.
85. Hunter DR, Haworth RA, Southard JH. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem.* 1976;251:5069–5077.
86. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys.* 1979;195:453–459.
87. Haworth RA, Hunter DR. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys.* 1979;195:460–467.

88. Hunter DR, Haworth RA. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195:468–477.
89. Fournier N, Ducet G, Crevat A. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr*. 1987;19:297–303.
90. Kinnally KW, Campo ML, Tedeschi H. Mitochondrial channel activity studied by patch-clamping mitoplasts. *J Bioenerg Biomembr*. 1989;21:497–506.
91. Szabó I, Zoratti M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem*. 1991;266:3376–3379.
92. Szabó I, Zoratti M. The mitochondrial megachannel is the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr*. 1992;24:111–117.
93. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94:909–950.
94. Bernardi P, von Stockum S. The permeability transition pore as a Ca²⁺ release channel: New answers to an old question. *Cell Calcium*. 2012;52:22–27.
95. Izzo V, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Kroemer G, Galluzzi L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol*. 2016;26:655–667.
96. Krauskopf A, Eriksson O, Craigen WJ, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:590–595.
97. Cheng EHY, Sheiko TV, Fisher JK, Craigen WJ, Korsmeyer SJ. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003;301:513–517.
98. Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD. Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol*. 2007;9:550–555.
99. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2004;61:372–385.
100. Brustovetsky N, Klingenberg M. Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca²⁺. *Biochemistry*. 1996;35:8483–8488.
101. Halestrap AP, Doran E, Gillespie JP, O'Toole A. Mitochondria and cell death. *Biochem Soc Trans*. 2000;28:170–177.
102. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004;427:461–465.

103. Bernardi P, Rasola A, Forte M, Lippe G. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2015;95:1111–1155.
104. Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Wenger RM, Bernardi P. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporin A-sensitive channel. *J Biol Chem.* 1996;271:2185–2192.
105. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkenkin JD. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature.* 2005;434:658–662.
106. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* 2005;280:18558–18561.
107. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, Inohara H, Kubo T, Tsujimoto Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature.* 2005;434:652–658.
108. Hafner AV, Dai J, Gomes AP, Xiao C-Y, Palmeira CM, Rosenzweig A, Sinclair DA. Regulation of the mPTP by SIRT3-mediated deacetylation of CypD at lysine 166 suppresses age-related cardiac hypertrophy. *Aging.* 2010;2:914–923.
109. Kohr MJ, Aponte AM, Sun J, Wang G, Murphy E, Gucek M, Steenbergen C. Characterization of potential S-nitrosylation sites in the myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H1327-1335.
110. Nguyen TT, Stevens MV, Kohr M, Steenbergen C, Sack MN, Murphy E. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem.* 2011;286:40184–40192.
111. Rasola A, Sciacovelli M, Chiara F, Pantic B, Brusilow WS, Bernardi P. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:726–731.
112. Leung AWC, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem.* 2008;283:26312–26323.
113. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46:821–831.
114. Varanyuwatana P, Halestrap AP. The roles of phosphate and the phosphate carrier in the mitochondrial permeability transition pore. *Mitochondrion.* 2012;12:120–125.

115. Gutiérrez-Aguilar M, Douglas DL, Gibson AK, Domeier TL, Molkentin JD, Baines CP. Genetic manipulation of the cardiac mitochondrial phosphate carrier does not affect permeability transition. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;72:316–325.
116. Herick K, Krämer R, Lühring H. Patch clamp investigation into the phosphate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1321:207–220.
117. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;379:62–73.
118. Kinnally KW, Zorov DB, Antonenko YN, Snyder SH, McEnery MW, Tedeschi H. Mitochondrial benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1374–1378.
119. McEnery MW, Snowman AM, Trifiletti RR, Snyder SH. Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:3170–3174.
120. Pastorino JG, Simbula G, Gilfor E, Hoek JB, Farber JL. Protoporphyrin IX, an endogenous ligand of the peripheral benzodiazepine receptor, potentiates induction of the mitochondrial permeability transition and the killing of cultured hepatocytes by rotenone. *J Biol Chem.* 1994;269:31041–31046.
121. Šileikytė J, Blachly-Dyson E, Sewell R, Carpi A, Menabò R, Di Lisa F, Ricchelli F, Bernardi P, Forte M. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by the outer membrane does not involve the peripheral benzodiazepine receptor (Translocator Protein of 18 kDa (TSPO)). *J Biol Chem.* 2014;289:13769–13781.
122. Cleary J, Johnson KM, Pipari AW, Glick GD. Inhibition of the mitochondrial F1F0-ATPase by ligands of the peripheral benzodiazepine receptor. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17:1667–1670.
123. Roy SS, Madesh M, Davies E, Antonsson B, Danial N, Hajnóczky G. Bad targets the permeability transition pore independent of Bax or Bak to switch between Ca²⁺-dependent cell survival and death. *Mol Cell.* 2009;33:377–388.
124. Karch J, Kwong JQ, Burr AR, Sargent MA, Elrod JW, Peixoto PM, Martinez-Caballero S, Osinska H, Cheng EH-Y, Robbins J, Kinnally KW, Molkentin JD. Bax and Bak function as the outer membrane component of the mitochondrial permeability pore in regulating necrotic cell death in mice. *eLife.* 2013;2:e00772.
125. Atorino L, Silvestri L, Koppen M, Cassina L, Ballabio A, Marconi R, Langer T, Casari G. Loss of m-AAA protease in mitochondria causes complex I deficiency and increased sensitivity to oxidative stress in hereditary spastic paraplegia. *J Cell Biol.* 2003;163:777–787.

126. Shanmughapriya S, Rajan S, Hoffman NE, Higgins AM, Tomar D, Nemani N, Hines KJ, Smith DJ, Eguchi A, Vallem S, Shaikh F, Cheung M, Leonard NJ, Stolakis RS, Wolfers MP, Ibeti J, Chuprun JK, Jog NR, Houser SR, Koch WJ, Elrod JW, Madesh M. SPG7 Is an Essential and Conserved Component of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Mol Cell*. 2015;60:47–62.
127. Giorgio V, von Stockum S, Antoniel M, Fabbro A, Fogolari F, Forte M, Glick GD, Petronilli V, Zoratti M, Szabó I, Lippe G, Bernardi P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:5887–5892.
128. Giorgio V, Guo L, Bassot C, Petronilli V, Bernardi P. Calcium and regulation of the mitochondrial permeability transition. *Cell Calcium*. 2018;70:56–63.
129. Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G. Cyclophilin D modulates mitochondrial F₀F₁-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem*. 2009;284:33982–33988.
130. Carraro M, Giorgio V, Šileikytė J, Sartori G, Forte M, Lippe G, Zoratti M, Szabò I, Bernardi P. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*. 2014;289:15980–15985.
131. Biasutto L, Azzolini M, Szabò I, Zoratti M. The mitochondrial permeability transition pore in AD 2016: An update. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863:2515–2530.
132. Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition pore: molecular nature and role as a target in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;78:100–106.
133. He J, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. Permeability transition in human mitochondria persists in the absence of peripheral stalk subunits of ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:9086–9091.
134. Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*. 2013;4:95.
135. Martel C, Huynh LH, Garnier A, Ventura-Clapier R, Brenner C. Inhibition of the Mitochondrial Permeability Transition for Cytoprotection: Direct versus Indirect Mechanisms. *Biochem Res Int*. 2012;2012:213403.
136. Mathieu Panel, Bijan Ghaleh, Didier Morin. Targeting mitochondrial permeability as a pharmacological cardioprotective strategy. *Medical Research Archives*. 2017;5:1–31.
137. Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*. 1960;70:68–78.

138. Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting Myocardial Reperfusion Injury--The Search Continues. *N Engl J Med.* 2015;373:1073–1075.
139. Ovize M, Baxter GF, Di Lisa F, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, Hausenloy DJ, Heusch G, Vinten-Johansen J, Yellon DM, Schulz R, Working Group of Cellular Biology of Heart of European Society of Cardiology. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand? Position paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovasc Res.* 2010;87:406–423.
140. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijević D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord ENJ, Smith AC, Eyassu F, Shirley R, Hu C-H, Dare AJ, James AM, Rogatti S, Hartley RC, Eaton S, Costa ASH, Brookes PS, Davidson SM, Duchon MR, Saeb-Parsy K, Shattock MJ, Robinson AJ, Work LM, Frezza C, Krieg T, Murphy MP. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature.* 2014;515:431–435.
141. Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol.* 2015;6:524–551.
142. Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS.* 1996;76:99–114.
143. Weiss JN, Korge P, Honda HM, Ping P. Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res.* 2003;93:292–301.
144. Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry.* 1993;32:4461–4465.
145. Scorrano L, Nicolli A, Basso E, Petronilli V, Bernardi P. Two modes of activation of the permeability transition pore: the role of mitochondrial cyclophilin. *Mol Cell Biochem.* 1997;174:181–184.
146. Kristian T, Bernardi P, Siesjö BK. Acidosis promotes the permeability transition in energized mitochondria: implications for reperfusion injury. *J Neurotrauma.* 2001;18:1059–1074.
147. Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem.* 2008;283:26307–26311.
148. Seidlmayer LK, Gomez-Garcia MR, Blatter LA, Pavlov E, Dedkova EN. Inorganic polyphosphate is a potent activator of the mitochondrial permeability transition pore in cardiac myocytes. *J Gen Physiol.* 2012;139:321–331.

149. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol.* 1973;5:395–407.
150. Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291:C1082-1088.
151. Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem.* 1996;271:6746–6751.
152. Görlach A, Bertram K, Hudecova S, Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.* 2015;6:260–271.
153. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 2011;50:222–233.
154. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26:239–257.
155. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, Dawson TM, Dawson VL, El-Deiry WS, Fulda S, Gottlieb E, Green DR, Hengartner MO, Kepp O, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Lu X, Madeo F, Malorni W, Mehlen P, Nuñez G, Peter ME, Piacentini M, Rubinsztein DC, Shi Y, Simon H-U, Vandenabeele P, White E, Yuan J, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19:107–120.
156. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci.* 2007;32:37–43.
157. Zong W-X, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev.* 2006;20:1–15.
158. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:135–147.
159. Feoktistova M, Leverkus M. Programmed necrosis and necroptosis signalling. *FEBS J.* 2015;282:19–31.
160. Eefting F, Rensing B, Wigman J, Pannekoek WJ, Liu WM, Cramer MJ, Lips DJ, Doevendans PA. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:414–426.
161. Tait SWG, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:621–632.

162. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13:89–102.
163. Przyklenk K, Dong Y, Undyala VV, Whittaker P. Autophagy as a therapeutic target for ischaemia /reperfusion injury? Concepts, controversies, and challenges. *Cardiovasc Res.* 2012;94:197–205.
164. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, Asano T, Levine B, Sadoshima J. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res.* 2007;100:914–922.
165. Valentim L, Laurence KM, Townsend PA, Carroll CJ, Soond S, Scarabelli TM, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Urocortin inhibits Beclin1-mediated autophagic cell death in cardiac myocytes exposed to ischaemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:846–852.
166. Gurusamy N, Lekli I, Mukherjee S, Ray D, Ahsan MK, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by resveratrol: a novel mechanism via autophagy involving the mTORC2 pathway. *Cardiovasc Res.* 2010;86:103–112.
167. Cao DJ, Gillette TG, Hill JA. Cardiomyocyte autophagy: remodeling, repairing, and reconstructing the heart. *Curr Hypertens Rep.* 2009;11:406–411.
168. Gustafsson AB, Gottlieb RA. Autophagy in ischemic heart disease. *Circ Res.* 2009;104:150–158.
169. Luc G, Baert V, Escutnaire J, Genin M, Vilhelm C, Di Pompéo C, Khoury CE, Segal N, Wiel E, Adnet F, Tazarourte K, Gueugniaud P-Y, Hubert H, On behalf GR-RéAC. Epidemiology of out-of-hospital cardiac arrest: A French national incidence and mid-term survival rate study. *Anaesth Crit Care Pain Med.* 2019;38:131–135.
170. Nordberg P, Taccone FS, Truhlar A, Forsberg S, Hollenberg J, Jonsson M, Cuny J, Goldstein P, Vermeersch N, Higuete A, Jiménez FC, Ortiz FR, Williams J, Desruelles D, Creteur J, Dillenbeck E, Busche C, Busch H-J, Ringh M, Konrad D, Peterson J, Vincent J-L, Svensson L. Effect of Trans-Nasal Evaporative Intra-arrest Cooling on Functional Neurologic Outcome in Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The PRINCESS Randomized Clinical Trial. *JAMA.* 2019;321:1677–1685.
171. Allen BS, Ko Y, Buckberg GD, Tan Z. Studies of isolated global brain ischaemia: II. Controlled reperfusion provides complete neurologic recovery following 30 min of warm ischaemia - the importance of perfusion pressure. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2012;41:1147–1154.
172. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124–1136.

173. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83:1113–1151.
174. Hausenloy DJ. Cardioprotection techniques: preconditioning, postconditioning and remote conditioning (basic science). *Curr Pharm Des.* 2013;19:4544–4563.
175. Bulluck H, Hausenloy DJ. Ischaemic conditioning: are we there yet? *Heart.* 2015;101:1067–1077.
176. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation.* 1993;88:1264–1272.
177. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res.* 1993;72:1293–1299.
178. Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet.* 1993;342:276–277.
179. Walsh SR, Tang TY, Kullar P, Jenkins DP, Dutka DP, Gaunt ME. Ischaemic preconditioning during cardiac surgery: systematic review and meta-analysis of perioperative outcomes in randomised clinical trials. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 2008;34:985–994.
180. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang N-P, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H579-588.
181. Na HS, Kim YI, Yoon YW, Han HC, Nahm SH, Hong SK. Ventricular premature beat-driven intermittent restoration of coronary blood flow reduces the incidence of reperfusion-induced ventricular fibrillation in a cat model of regional ischemia. *Am Heart J.* 1996;132:78–83.
182. Heusch G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning. *Circ Res.* 2015;116:674–699.
183. Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic “preconditioning” protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. *Circulation.* 1993;87:893–899.
184. Gho BC, Schoemaker RG, van den Doel MA, Duncker DJ, Verdouw PD. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue. *Circulation.* 1996;94:2193–2200.
185. Oxman T, Arad M, Klein R, Avazov N, Rabinowitz B. Limb ischemia preconditions the heart against reperfusion tachyarrhythmia. *Am J Physiol.* 1997;273:H1707-1712.

186. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, Shimizu M, Li J, Cheung M, White PA, Kristiansen SB, Sorensen K, Dzavik V, Redington AN, Kharbanda RK. Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H1883-1890.
187. Kerendi F, Kin H, Halkos ME, Jiang R, Zatta AJ, Zhao Z-Q, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduces myocardial infarct size via endogenous activation of adenosine receptors. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:404–412.
188. Andreka G, Vertesaljai M, Szantho G, Font G, Piroth Z, Fontos G, Juhasz ED, Szekely L, Szelid Z, Turner MS, Ashrafian H, Frenneaux MP, Andreka P. Remote ischaemic postconditioning protects the heart during acute myocardial infarction in pigs. *Heart.* 2007;93:749–752.
189. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 2015;65:177–195.
190. Man C, Gong D, Zhou Y, Fan Y. Meta-analysis of remote ischemic conditioning in patients with acute myocardial infarction. *Sci Rep.* 2017;7:43529.
191. Tang W, Weil MH, Sun S, Pernat A, Mason E. K(ATP) channel activation reduces the severity of postresuscitation myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H1609-1615.
192. Segal N, Matsuura T, Caldwell E, Sarraf M, McKnite S, Zviman M, Aufderheide TP, Halperin HR, Lurie KG, Yannopoulos D. Ischemic postconditioning at the initiation of cardiopulmonary resuscitation facilitates functional cardiac and cerebral recovery after prolonged untreated ventricular fibrillation. *Resuscitation.* 2012;83:1397–1403.
193. Bartos JA, Matsuura TR, Sarraf M, Youngquist ST, McKnite SH, Rees JN, Sloper DT, Bates FS, Segal N, Debaty G, Lurie KG, Neumar RW, Metzger JM, Riess ML, Yannopoulos D. Bundled postconditioning therapies improve hemodynamics and neurologic recovery after 17 min of untreated cardiac arrest. *Resuscitation.* 2015;87:7–13.
194. Debaty G, Lurie K, Metzger A, Lick M, Bartos JA, Rees JN, McKnite S, Puertas L, Pepe P, Fowler R, Yannopoulos D. Reperfusion injury protection during Basic Life Support improves circulation and survival outcomes in a porcine model of prolonged cardiac arrest. *Resuscitation.* 2016;105:29–35.
195. Dave KR, Saul I, Prado R, Busto R, Perez-Pinzon MA. Remote organ ischemic preconditioning protect brain from ischemic damage following asphyxial cardiac arrest. *Neurosci Lett.* 2006;404:170–175.

196. Jensen HA, Loukogeorgakis S, Yannopoulos F, Rimpiläinen E, Petzold A, Tuominen H, Lepola P, Macallister RJ, Deanfield JE, Mäkelä T, Alestalo K, Kiviluoma K, Anttila V, Tsang V, Juvonen T. Remote ischemic preconditioning protects the brain against injury after hypothermic circulatory arrest. *Circulation*. 2011;123:714–721.
197. Albrecht M, Meybohm P, Broch O, Zitta K, Hein M, Gräsner J-T, Renner J, Bein B, Gruenewald M. Evaluation of remote ischaemic post-conditioning in a pig model of cardiac arrest: A pilot study. *Resuscitation*. 2015;93:89–95.
198. Xu J, Sun S, Lu X, Hu X, Yang M, Tang W. Remote ischemic pre- and postconditioning improve postresuscitation myocardial and cerebral function in a rat model of cardiac arrest and resuscitation. *Crit Care Med*. 2015;43:e12-18.
199. Xu J, Huang Z, Ye S, Wang M, Fang Y, Li Z. Remote Postconditioning Alone and Combined with Hypothermia Improved Postresuscitation Cardiac and Neurological Outcomes in Swine. *BioMed Res Int*. 2016;2016:6743648.
200. Gysembergh A, Margonari H, Loufoua J, Ovize A, André-Fouët X, Minaire Y, Ovize M. Stretch-induced protection shares a common mechanism with ischemic preconditioning in rabbit heart. *Am J Physiol*. 1998;274:H955-964.
201. Wallbridge DR, Schulz R, Braun C, Post H, Heusch G. No attenuation of ischaemic preconditioning by the calcium antagonist nisoldipine. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28:1801–1810.
202. Miyawaki H, Ashraf M. Ca²⁺ as a mediator of ischemic preconditioning. *Circ Res*. 1997;80:790–799.
203. Korichneva I, Hoyos B, Chua R, Levi E, Hammerling U. Zinc release from protein kinase C as the common event during activation by lipid second messenger or reactive oxygen. *J Biol Chem*. 2002;277:44327–44331.
204. Samavati L, Monick MM, Sanlioglu S, Buettner GR, Oberley LW, Hunninghake GW. Mitochondrial K(ATP) channel openers activate the ERK kinase by an oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C273-281.
205. Tullio F, Angotti C, Perrelli M-G, Penna C, Pagliaro P. Redox balance and cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:392.
206. Schulz R, Kelm M, Heusch G. Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 2004;61:402–413.
207. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G, Pagliaro P. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol*. 2006;101:180–189.

208. Rassaf T, Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Shiva S, Heusch G, Kelm M. Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning. *Circ Res*. 2014;114:1601–1610.
209. Andreadou I, Iliodromitis EK, Rassaf T, Schulz R, Papapetropoulos A, Ferdinandy P. The role of gasotransmitters NO, H₂S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning. *Br J Pharmacol*. 2015;172:1587–1606.
210. Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*. 1991;84:350–356.
211. Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria. *Circulation*. 2008;118:1915–1919.
212. Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial K(ATP) channels. *Circ Res*. 2001;89:273–278.
213. Krieg T, Cui L, Qin Q, Cohen MV, Downey JM. Mitochondrial ROS generation following acetylcholine-induced EGF receptor transactivation requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *J Mol Cell Cardiol*. 2004;36:435–443.
214. Liu Y, Tsuchida A, Cohen MV, Downey JM. Pretreatment with angiotensin II activates protein kinase C and limits myocardial infarction in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:883–892.
215. Dawn B. Preconditioning by angiotensin II: a tale of more than two kinases. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41:223–225.
216. Tejero-Taldo MI, Gursoy E, Zhao TC, Kukreja RC. Alpha-adrenergic receptor stimulation produces late preconditioning through inducible nitric oxide synthase in mouse heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:185–195.
217. Kudej RK, Shen Y-T, Peppas AP, Huang C-H, Chen W, Yan L, Vatner DE, Vatner SF. Obligatory role of cardiac nerves and alpha1-adrenergic receptors for the second window of ischemic preconditioning in conscious pigs. *Circ Res*. 2006;99:1270–1276.
218. Hide EJ, Piper J, Thiemermann C. Endothelin-1-induced reduction of myocardial infarct size by activation of ATP-sensitive potassium channels in a rabbit model of myocardial ischaemia and reperfusion. *Br J Pharmacol*. 1995;116:2597–2602.
219. Erikson JM, Velasco CE. Endothelin-1 and myocardial preconditioning. *Am Heart J*. 1996;132:84–90.

220. Schultz JE, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol.* 1995;268:H2157-2161.
221. Lecour S, Suleman N, Deuchar GA, Somers S, Lacerda L, Huisamen B, Opie LH. Pharmacological preconditioning with tumor necrosis factor-alpha activates signal transducer and activator of transcription-3 at reperfusion without involving classic prosurvival kinases (Akt and extracellular signal-regulated kinase). *Circulation.* 2005;112:3911–3918.
222. Smith RM, Suleman N, McCarthy J, Sack MN. Classic ischemic but not pharmacologic preconditioning is abrogated following genetic ablation of the TNFalpha gene. *Cardiovasc Res.* 2002;55:553–560.
223. Lacerda L, Somers S, Opie LH, Lecour S. Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res.* 2009;84:201–208.
224. Zuurbier CJ, Jong WMC, Eerbeek O, Koeman A, Pulskens WP, Butter LM, Leemans JC, Hollmann MW. Deletion of the innate immune NLRP3 receptor abolishes cardiac ischemic preconditioning and is associated with decreased IL-6/STAT3 signaling. *PloS One.* 2012;7:e40643.
225. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol.* 1994;266:H1145-1152.
226. Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of protein kinase C isoforms epsilon and eta in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total protein kinase C activity. *Circ Res.* 1997;81:404–414.
227. Liu H, McPherson BC, Yao Z. Preconditioning attenuates apoptosis and necrosis: role of protein kinase C epsilon and -delta isoforms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H404-410.
228. Feuerstein GZ, Young PR. Apoptosis in cardiac diseases: stress- and mitogen-activated signaling pathways. *Cardiovasc Res.* 2000;45:560–569.
229. Fryer RM, Patel HH, Hsu AK, Gross GJ. Stress-activated protein kinase phosphorylation during cardioprotection in the ischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;281:H1184-1192.
230. Newby LK, Marber MS, Melloni C, Sarov-Blat L, Aberle LH, Aylward PE, Cai G, de Winter RJ, Hamm CW, Heitner JF, Kim R, Lerman A, Patel MR, Tanguay J-F, Lepore JJ, Al-Khalidi HR, Sprecher DL, Granger CB, SOLSTICE Investigators. Losmapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, in non-ST-segment elevation myocardial infarction: a randomised phase 2 trial. *Lancet.* 2014;384:1187–1195.

231. Behrends M, Schulz R, Post H, Alexandrov A, Belosjorow S, Michel MC, Heusch G. Inconsistent relation of MAPK activation to infarct size reduction by ischemic preconditioning in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H1111-1119.
232. Fryer RM, Pratt PF, Hsu AK, Gross GJ. Differential activation of extracellular signal regulated kinase isoforms in preconditioning and opioid-induced cardioprotection. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001;296:642–649.
233. Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang X-M, Philipp S, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H468-476.
234. Burley DS, Ferdinandy P, Baxter GF. Cyclic GMP and protein kinase-G in myocardial ischaemia-reperfusion: opportunities and obstacles for survival signaling. *Br J Pharmacol*. 2007;152:855–869.
235. Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P. Intermittent activation of bradykinin B2 receptors and mitochondrial KATP channels trigger cardiac postconditioning through redox signaling. *Cardiovasc Res*. 2007;75:168–177.
236. Tong H, Chen W, Steenbergen C, Murphy E. Ischemic preconditioning activates phosphatidylinositol-3-kinase upstream of protein kinase C. *Circ Res*. 2000;87:309–315.
237. Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res*. 2004;61:448–460.
238. Mocanu MM, Bell RM, Yellon DM. PI3 kinase and not p42/p44 appears to be implicated in the protection conferred by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:661–668.
239. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*. 2002;90:377–379.
240. Juhaszova M, Zorov DB, Kim S-H, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*. 2004;113:1535–1549.
241. Juhaszova M, Zorov DB, Yaniv Y, Nuss HB, Wang S, Sollott SJ. Role of glycogen synthase kinase-3beta in cardioprotection. *Circ Res*. 2009;104:1240–1252.
242. Vessey DA, Kelley M, Li L, Huang Y, Zhou H-Z, Zhu BQ, Karliner JS. Role of sphingosine kinase activity in protection of heart against ischemia reperfusion injury. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2006;12:BR318-324.

243. Jin Z-Q, Karliner JS, Vessey DA. Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation. *Cardiovasc Res.* 2008;79:134–140.
244. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther.* 2008;120:172–185.
245. Smith RM, Suleman N, Lacerda L, Opie LH, Akira S, Chien KR, Sack MN. Genetic depletion of cardiac myocyte STAT-3 abolishes classical preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004;63:611–616.
246. Suleman N, Somers S, Smith R, Opie LH, Lecour SC. Dual activation of STAT-3 and Akt is required during the trigger phase of ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2008;79:127–133.
247. Kalakech H, Hibert P, Prunier-Mirebeau D, Tamarelle S, Letournel F, Macchi L, Pinet F, Furber A, Prunier F. RISK and SAFE signaling pathway involvement in apolipoprotein A-I-induced cardioprotection. *PLoS One.* 2014;9:e107950.
248. Yang C, Talukder MAH, Varadharaj S, Velayutham M, Zweier JL. Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation. *Cardiovasc Res.* 2013;97:33–43.
249. Sukhodub A, Jovanović S, Du Q, Budas G, Clelland AK, Shen M, Sakamoto K, Tian R, Jovanović A. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K(+) channels. *J Cell Physiol.* 2007;210:224–236.
250. Ji L, Zhang X, Liu W, Huang Q, Yang W, Fu F, Ma H, Su H, Wang H, Wang J, Zhang H, Gao F. AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury. *PLoS One.* 2013;8:e69910.
251. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, Wei C, Trush MA, Semenza GL. Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 alpha. *Cardiovasc Res.* 2008;77:463–470.
252. Ong S-G, Lee WH, Theodorou L, Kodo K, Lim SY, Shukla DH, Briston T, Kiriakidis S, Ashcroft M, Davidson SM, Maxwell PH, Yellon DM, Hausenloy DJ. HIF-1 reduces ischaemia-reperfusion injury in the heart by targeting the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 2014;104:24–36.
253. Xu M, Wang Y, Hirai K, Ayub A, Ashraf M. Calcium preconditioning inhibits mitochondrial permeability transition and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H899-908.

254. Hausenloy DJ, Maddock HL, Baxter GF, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res*. 2002;55:534–543.
255. Argaud L, Gateau-Roesch O, Chalabreysse L, Gomez L, Loufouat J, Thivolet-Béjui F, Robert D, Ovize M. Preconditioning delays Ca²⁺-induced mitochondrial permeability transition. *Cardiovasc Res*. 2004;61:115–122.
256. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005;111:194–197.
257. Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H841-849.
258. Argaud L, Gomez L, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Trimetazidine inhibits mitochondrial permeability transition pore opening and prevents lethal ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;39:893–899.
259. Piot C, Croisille P, Staat P, Thibault H, Rioufol G, Mewton N, Elbelghiti R, Cung TT, Bonnefoy E, Angoulvant D, Macia C, Raczka F, Sportouch C, Gahide G, Finet G, André-Fouët X, Revel D, Kirkorian G, Monassier J-P, Derumeaux G, Ovize M. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008;359:473–481.
260. Cung T-T, Morel O, Cayla G, Rioufol G, Garcia-Dorado D, Angoulvant D, Bonnefoy-Cudraz E, Guérin P, Elbaz M, Delarche N, Coste P, Vanzetto G, Metge M, Aupetit J-F, Jouve B, Motreff P, Tron C, Labeque J-N, Steg PG, Cottin Y, Range G, Clerc J, Claeys MJ, Coussement P, Prunier F, Moulin F, Roth O, Belle L, Dubois P, Barragan P, Gilard M, Piot C, Colin P, De Poli F, Morice M-C, Ider O, Dubois-Randé J-L, Untersee T, Le Breton H, Béard T, Blanchard D, Grollier G, Malquarti V, Staat P, Sudre A, Elmer E, Hansson MJ, Bergerot C, Boussaha I, Jossan C, Derumeaux G, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2015;373:1021–1031.
261. Auchampach JA, Cavero I, Gross GJ. Nicorandil attenuates myocardial dysfunction associated with transient ischemia by opening ATP-dependent potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20:765–771.
262. Grover GJ, Dzwonczyk S, Sleph PG, Sargent CA. The ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide (glyburide) does not abolish preconditioning in isolated ischemic rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;265:559–564.
263. Tomai F, Crea F, Gaspardone A, Versaci F, De Paulis R, Penta de Peppo A, Chiariello L, Giofrè PA. Ischemic preconditioning during coronary angioplasty is prevented by glibenclamide, a selective ATP-sensitive K⁺ channel blocker. *Circulation*. 1994;90:700–705.

264. Mubagwa K. KATP channels in ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 1994;28:929–930.
265. O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res.* 2004;94:420–432.
266. Ardehali H, O'Rourke B, Marbán E. Cardioprotective role of the mitochondrial ATP-binding cassette protein 1. *Circ Res.* 2005;97:740–742.
267. Costa ADT, Garlid KD. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKC ϵ , ROS, and MPT. *Am J Physiol - Heart Circ Physiol.* 2008;295:H874–H882.
268. Jabůrek M, Costa ADT, Burton JR, Costa CL, Garlid KD. Mitochondrial PKC epsilon and mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel copurify and coreconstitute to form a functioning signaling module in proteoliposomes. *Circ Res.* 2006;99:878–883.
269. Kristiansen SB, Henning O, Kharbanda RK, Nielsen-Kudsk JE, Schmidt MR, Redington AN, Nielsen TT, Bøtker HE. Remote preconditioning reduces ischemic injury in the explanted heart by a KATP channel-dependent mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H1252-1256.
270. Li X, Heinzl FR, Boengler K, Schulz R, Heusch G. Role of connexin 43 in ischemic preconditioning does not involve intercellular communication through gap junctions. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:161–163.
271. Schulz R, Boengler K, Totzeck A, Luo Y, Garcia-Dorado D, Heusch G. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning. *Heart Fail Rev.* 2007;12:261–266.
272. Boengler K, Ruiz-Meana M, Gent S, Ungefug E, Soetkamp D, Miro-Casas E, Cabestrero A, Fernandez-Sanz C, Semenzato M, Di Lisa F, Rohrbach S, Garcia-Dorado D, Heusch G, Schulz R. Mitochondrial connexin 43 impacts on respiratory complex I activity and mitochondrial oxygen consumption. *J Cell Mol Med.* 2012;16:1649–1655.
273. Calmettes G, Ribalet B, John S, Korge P, Ping P, Weiss JN. Hexokinases and cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2015;78:107–115.
274. Roberts DJ, Tan-Sah VP, Smith JM, Miyamoto S. Akt phosphorylates HK-II at Thr-473 and increases mitochondrial HK-II association to protect cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2013;288:23798–23806.
275. Sun J, Aponte AM, Kohr MJ, Tong G, Steenbergen C, Murphy E. Essential role of nitric oxide in acute ischemic preconditioning: S-nitros(yl)ation versus sGC/cGMP/PKG signaling? *Free Radic Biol Med.* 2013;54:105–112.

276. Methner C, Lukowski R, Grube K, Loga F, Smith RAJ, Murphy MP, Hofmann F, Krieg T. Protection through postconditioning or a mitochondria-targeted S-nitrosothiol is unaffected by cardiomyocyte-selective ablation of protein kinase G. *Basic Res Cardiol*. 2013;108:337.
277. Grall S, Prunier-Mirebeau D, Tamareille S, Mateus V, Lamon D, Furber A, Prunier F. Endoplasmic reticulum stress pathway involvement in local and remote myocardial ischemic conditioning. *Shock*. 2013;39:433–439.
278. Dickson EW, Reinhardt CP, Renzi FP, Becker RC, Porcaro WA, Heard SO. Ischemic preconditioning may be transferable via whole blood transfusion: preliminary evidence. *J Thromb Thrombolysis*. 1999;8:123–129.
279. Lim SY, Yellon DM, Hausenloy DJ. The neural and humoral pathways in remote limb ischemic preconditioning. *Basic Res Cardiol*. 2010;105:651–655.
280. Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, Gilbey MP, Spyer KM, Teschemacher AG, Kasparov S, Trapp S, Ackland GL, Gourine AV. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurones. *Cardiovasc Res*. 2012;95:487–494.
281. Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, Pérez V, Inserte J, García-Dorado D, Gelpi RJ. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning. *Exp Physiol*. 2013;98:425–434.
282. Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13:193–209.
283. Borel JF, Feurer C, Gubler HU, Stähelin H. Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent. *Agents Actions*. 1976;6:468–475.
284. Jung K, Pergande M. Influence of cyclosporin A on the respiration of isolated rat kidney mitochondria. *FEBS Lett*. 1985;183:167–169.
285. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*. 1988;255:357–360.
286. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca²⁺(+)-induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J*. 1990;268:153–160.
287. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:1351–1354.
288. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:1461–1469.

289. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*. 2001;276:2571–2575.
290. Cai Q, Baxter GF, Yellon DM. Reduction of infarct size in isolated rat heart by CsA and FK506: possible role of phosphatase inhibition. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1998;12:499–501.
291. Weinbrenner C, Liu GS, Downey JM, Cohen MV. Cyclosporine A limits myocardial infarct size even when administered after onset of ischemia. *Cardiovasc Res*. 1998;38:676–684.
292. Minners J, van den Bos EJ, Yellon DM, Schwalb H, Opie LH, Sack MN. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 2000;47:68–73.
293. Schneider A, Ad N, Izhar U, Khaliulin I, Borman JB, Schwalb H. Protection of myocardium by cyclosporin A and insulin: in vitro simulated ischemia study in human myocardium. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:1240–1245.
294. Ottani F, Latini R, Staszewsky L, La Vecchia L, Locuratolo N, Sicuro M, Masson S, Barlera S, Milani V, Lombardi M, Costalunga A, Mollicelli N, Santarelli A, De Cesare N, Sganzerla P, Boi A, Maggioni AP, Limbruno U, CYCLE Investigators. Cyclosporine A in Reperfused Myocardial Infarction: The Multicenter, Controlled, Open-Label CYCLE Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:365–374.
295. Trankle C, Thurber CJ, Toldo S, Abbate A. Mitochondrial Membrane Permeability Inhibitors in Acute Myocardial Infarction: Still Awaiting Translation. *JACC Basic Transl Sci*. 2016;1:524–535.
296. Mewton N, Croisille P, Gahide G, Rioufol G, Bonnefoy E, Sanchez I, Cung TT, Sportouch C, Angoulvant D, Finet G, André-Fouët X, Derumeaux G, Piot C, Vernhet H, Revel D, Ovize M. Effect of cyclosporine on left ventricular remodeling after reperfused myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1200–1205.
297. Ghaffari S, Kazemi B, Toluey M, Sepehrvand N. The effect of prethrombolytic cyclosporine-A injection on clinical outcome of acute anterior ST-elevation myocardial infarction. *Cardiovasc Ther*. 2013;31:e34-39.
298. Chiari P, Angoulvant D, Mewton N, Desebbe O, Obadia J-F, Robin J, Farhat F, Jegaden O, Bastien O, Lehot J-J, Ovize M. Cyclosporine protects the heart during aortic valve surgery. *Anesthesiology*. 2014;121:232–238.
299. Hausenloy D, Kunst G, Boston-Griffiths E, Kolvekar S, Chaubey S, John L, Desai J, Yellon D. The effect of cyclosporin-A on peri-operative myocardial injury in adult patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomised controlled clinical trial. *Heart*. 2014;100:544–549.

300. Osman MM, Lulic D, Glover L, Stahl CE, Lau T, van Loveren H, Borlongan CV. Cyclosporine-A as a neuroprotective agent against stroke: its translation from laboratory research to clinical application. *Neuropeptides*. 2011;45:359–368.
301. Borlongan CV, Fujisaki T, Watanabe S. Chronic cyclosporine-A injection in rats with damaged blood-brain barrier does not impair retention of passive avoidance. *Neurosci Res*. 1998;32:195–200.
302. Leventhal L, Sortwell CE, Hanbury R, Collier TJ, Kordower JH, Palfi S. Cyclosporin A protects striatal neurons in vitro and in vivo from 3-nitropropionic acid toxicity. *J Comp Neurol*. 2000;425:471–478.
303. Peterson JW, Nishizawa S, Hackett JD, Bun T, Teramura A, Zervas NT. Cyclosporine A reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in dogs. *Stroke*. 1990;21:133–137.
304. Shiga Y, Onodera H, Matsuo Y, Kogure K. Cyclosporin A protects against ischemia-reperfusion injury in the brain. *Brain Res*. 1992;595:145–148.
305. Uchino H, Elmér E, Uchino K, Li PA, He QP, Smith ML, Siesjö BK. Amelioration by cyclosporin A of brain damage in transient forebrain ischemia in the rat. *Brain Res*. 1998;812:216–226.
306. Matsumoto S, Friberg H, Ferrand-Drake M, Wieloch T. Blockade of the mitochondrial permeability transition pore diminishes infarct size in the rat after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:736–741.
307. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, Hetz C, Danial NN, Moskowitz MA, Korsmeyer SJ. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12005–12010.
308. Empey PE, McNamara PJ, Young B, Rosbolt MB, Hatton J. Cyclosporin A disposition following acute traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2006;23:109–116.
309. Nighoghossian N, Berthezène Y, Mechtouff L, Derex L, Cho TH, Ritzenthaler T, Rheims S, Chauveau F, Béjot Y, Jacquin A, Giroud M, Ricolfi F, Philippeau F, Lamy C, Turc G, Bodiguel E, Domingo V, Guiraud V, Mas J-L, Oppenheim C, Amarenco P, Cakmak S, Sevin-Allouet M, Guillon B, Desal H, Hosseini H, Sibon I, Mahagne M-H, Ong E, Mewton N, Ovize M. Cyclosporine in acute ischemic stroke. *Neurology*. 2015;84:2216–2223.
310. Butterly DW, Spurney RF, Ruiz P, Griffiths R, Albrightson C, Coffman TM. A role for leukotrienes in cyclosporine nephrotoxicity. *Kidney Int*. 2000;57:2586–2593.
311. Olyaei AJ, de Mattos AM, Bennett WM. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: new insight and preventive strategies. *Curr Opin Crit Care*. 2001;7:384–389.

312. Prévot A, Semama DS, Tendron A, Justrabo E, Guignard JP, Gouyon JB. Endothelin, angiotensin II and adenosine in acute cyclosporine A nephrotoxicity. *Pediatr Nephrol Berl Ger.* 2000;14:927–934.
313. Wilasrusmee C, Da Silva M, Siddiqui J, Bruch D, Kittur S, Wilasrusmee S, Kittur DS. Role of endothelin-1 in microvascular dysfunction caused by cyclosporin A. *J Am Coll Surg.* 2003;196:584–591.
314. Hortelano S, Castilla M, Torres AM, Tejedor A, Boscá L. Potentiation by nitric oxide of cyclosporin A and FK506-induced apoptosis in renal proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:2315–2323.
315. Textor SC, Burnett JC, Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, Porayko M, Krom R, Gores G, Hay E. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int.* 1995;47:1426–1433.
316. Yang CW, Ahn HJ, Han HJ, Kim WY, Li C, Shin MJ, Kim SK, Park JH, Kim YS, Moon IS, Bang BK. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney. *Transplantation.* 2001;72:1753–1759.
317. Singh D, Chander V, Chopra K. Cyclosporine protects against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *Toxicology.* 2005;207:339–347.
318. Lemoine S, Pillot B, Rognant N, Augeul L, Rayberin M, Varennes A, Laville M, Ovize M, Juillard L. Postconditioning with cyclosporine a reduces early renal dysfunction by inhibiting mitochondrial permeability transition. *Transplantation.* 2015;99:717–723.
319. Lemoine S, Pillot B, Augeul L, Rabeyrin M, Varennes A, Normand G, Baetz D, Ovize M, Juillard L. Dose and timing of injections for effective cyclosporine A pretreatment before renal ischemia reperfusion in mice. *PloS One.* 2017;12:e0182358.
320. Hayashi T, Nagasue N, Kohno H, Chang YC, Nakamura T. Beneficial effect of cyclosporine pretreatment in preventing ischemic damage to the liver in dogs. *Transplantation.* 1988;46:923–924.
321. Kawano K, Kim YI, Kaketani K, Kobayashi M. The beneficial effect of cyclosporine on liver ischemia in rats. *Transplantation.* 1989;48:759–764.
322. Broekemeier KM, Pfeiffer DR. Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;163:561–566.
323. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation.* 1993;55:1265–1272.

324. Pastorino JG, Snyder JW, Serroni A, Hoek JB, Farber JL. Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 1993;268:13791–13798.
325. Travis DL, Fabia R, Netto GG, Husberg BS, Goldstein RM, Klintmalm GB, Levy MF. Protection by cyclosporine A against normothermic liver ischemia-reperfusion in pigs. *J Surg Res.* 1998;75:116–126.
326. Zhong Z, Theruvath TP, Currin RT, Waldmeier PC, Lemasters JJ. NIM811, a mitochondrial permeability transition inhibitor, prevents mitochondrial depolarization in small-for-size rat liver grafts. *Am J Transplant.* 2007;7:1103–1111.
327. Rehman H, Sun J, Shi Y, Ramshesh VK, Liu Q, Currin RT, Lemasters JJ, Zhong Z. NIM811 prevents mitochondrial dysfunction, attenuates liver injury, and stimulates liver regeneration after massive hepatectomy. *Transplantation.* 2011;91:406–412.
328. Fauvel H, Marchetti P, Obert G, Joulain O, Chopin C, Formstecher P, Nevière R. Protective effects of cyclosporin A from endotoxin-induced myocardial dysfunction and apoptosis in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:449–455.
329. Larche J, Lancel S, Hassoun SM, Favory R, Decoster B, Marchetti P, Chopin C, Neviere R. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:377–385.
330. Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G, Ferlito M, Deodato B, Arlotta M, Minutoli L, Campo GM, Bova A, Quartarone C, Urna G, Sardella A, Saitta A, Caputi AP. Protective effects of cyclosporin-A in splanchnic artery occlusion shock. *Br J Pharmacol.* 2000;130:339–344.
331. Cour M, Loufouat J, Paillard M, Augeul L, Goudable J, Ovize M, Argaud L. Inhibition of mitochondrial permeability transition to prevent the post-cardiac arrest syndrome: a pre-clinical study. *Eur Heart J.* 2011;32:226–235.
332. Huang C-H, Tsai M-S, Hsu C-Y, Su Y-J, Wang T-D, Chang W-T, Chen W-J. 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.
333. Liu J, Wang Y, Zhuang Q, Chen M, Wang Y, Hou L, Han F. Protective effects of cyclosporine A and hypothermia on neuronal mitochondria in a rat asphyxial cardiac arrest model. *Am J Emerg Med.* 2016;34:1080–1085.
334. Wang H, Olivero W, Wang D, Lanzino G. Cold as a therapeutic agent. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148:565–570; discussion 569-570.

335. Varon J, Acosta P. Therapeutic hypothermia: past, present, and future. *Chest*. 2008;133:1267–1274.
336. Bigelow WG, Lindsay WK, Greenwood WF. Hypothermia; its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. *Ann Surg*. 1950;132:849–866.
337. Rosomoff HL, Holaday DA. Cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption during hypothermia. *Am J Physiol*. 1954;179:85–88.
338. Marshall SB, Owens JC, Swan H. Temporary circulatory occlusion to the brain of the hypothermic dog. *AMA Arch Surg*. 1956;72:98–106.
339. McMurrey JD, Bernhard WF, Taren JA, Bering EA. Studies on hypothermia in monkeys. I. The effect of hypothermia on the prolongation of permissible time of total occlusion of the afferent circulation of the brain. *Surg Gynecol Obstet*. 1956;102:75–86.
340. Benson DW, Williams GR, Spencer FC, Yates AJ. The use of hypothermia after cardiac arrest. *Anesth Analg*. 1959;38:423–428.
341. Sterz F, Safar P, Tisherman S, Radovsky A, Kuboyama K, Oku K. Mild hypothermic cardiopulmonary resuscitation improves outcome after prolonged cardiac arrest in dogs. *Crit Care Med*. 1991;19:379–389.
342. Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Stezoski SW, Alexander H. 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.
343. 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.
344. Kiyosue T, Arita M, Muramatsu H, Spindler AJ, Noble D. Ionic mechanisms of action potential prolongation at low temperature in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol*. 1993;468:85–106.
345. Chien GL, Wolff RA, Davis RF, van Winkle DM. “Normothermic range” temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1014–1017.
346. Hale SL, Kloner RA. Myocardial temperature in acute myocardial infarction: protection with mild regional hypothermia. *Am J Physiol*. 1997;273:H220-227.
347. Stowe DF, Varadarajan SG, An J, Smart SC. Reduced cytosolic Ca(2+) loading and improved cardiac function after cardioplegic cold storage of guinea pig isolated hearts. *Circulation*. 2000;102:1172–1177.

348. van der Vusse GJ, van der Veen FH, Flameng W, Coumans W, Borgers M, Willems G, Suy R, de Meyere R, Reneman RS. A biochemical and ultrastructural study on myocardial changes during aorto-coronary bypass surgery: St. Thomas Hospital cardioplegia versus intermittent aortic cross-clamping at 34 and 25 degrees C. *Eur Surg Res.* 1986;18:1–11.
349. Smolenski RT, Lachno DR, Yacoub MH. Adenine nucleotide catabolism in human myocardium during heart and heart-lung transplantation. *Eur J Cardio-Thorac Surg.* 1992;6:25–30.
350. Sukehiro S, Dyszkiewics W, Minten J, Wynants J, Van Belle H, Flameng W. Catabolism of high energy phosphates during long-term cold storage of donor hearts: effects of extra- and intracellular fluid-type cardioplegic solutions and calcium channel blockers. *J Heart Lung Transplant.* 1991;10:387–393.
351. Bical O, Gerhardt MF, Paumier D, Gaillard D, Comas J, Landais P, Fischer M, Trivin F, Vanetti A. Comparison of different types of cardioplegia and reperfusion on myocardial metabolism and free radical activity. *Circulation.* 1991;84:III375-379.
352. Möllhoff T, Sukehiro S, Hendrickx M, Van Belle H, Flameng W. Effects of hypothermic ischemia on purine catabolism in canine, primate, and human myocardium. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;39:187–192.
353. Shirakura R, Matsuda H, Nakano S, Nakata S, Kaneko M, Takami H, Miyagawa S, Fukushima N, Kitagawa S, Naka Y. Myocardial energy metabolism in asphyxiated canine hearts preserved for 24 hours. *Transplantation.* 1992;53:1215–1218.
354. Chong YS, Cottier DS, Gavin JB. Myocardial protection during prolonged ischaemic cardiac arrest: experimental evaluation of three crystalloid cardioplegic solutions. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 1994;35:35–44.
355. Minten J, Flameng W, Dyszkiewicz W. Optimal storage temperature and benefit of hypothermic cardioplegic arrest for long-term preservation of donor hearts: a study in the dog. *Transpl Int.* 1988;1:19–25.
356. Simkhovich BZ, Hale SL, Kloner RA. Metabolic mechanism by which mild regional hypothermia preserves ischemic tissue. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2004;9:83–90.
357. Ning XH, Xu CS, Song YC, Xiao Y, Hu YJ, Lupinetti FM, Portman MA. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol.* 1998;274:H786-793.
358. Ichihara K, Robishaw JD, Vary TC, Neely JR. Protection of ischemic myocardium from metabolic products. *Acta Med Scand Suppl.* 1981;651:13–18.

359. Frank SM, Satitpunwaycha P, Bruce SR, Herscovitch P, Goldstein DS. Increased myocardial perfusion and sympathoadrenal activation during mild core hypothermia in awake humans. *Clin Sci*. 2003;104:503–508.
360. Knerr SM, Lieberman M. Ion transport during hypothermia in cultured heart cells: implications for protection of the immature myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:277–288.
361. Riess ML, Camara AKS, Kevin LG, An J, Stowe DF. Reduced reactive O₂ species formation and preserved mitochondrial NADH and [Ca²⁺] levels during short-term 17 degrees C ischemia in intact hearts. *Cardiovasc Res*. 2004;61:580–590.
362. Gambert S, Bès-Houtmann S, Vandroux D, Tissier C, Vergely-Vandriessse C, Rochette L, Athias P. Deep hypothermia during ischemia improves functional recovery and reduces free-radical generation in isolated reperfused rat heart. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23:487–491.
363. Shao Z-H, Sharp WW, Wojcik KR, Li C-Q, Han M, Chang W-T, Ramachandran S, Li J, Hamann KJ, Vanden Hoek TL. Therapeutic hypothermia cardioprotection via Akt- and nitric oxide-mediated attenuation of mitochondrial oxidants. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H2164-2173.
364. Yang X, Liu Y, Yang X-M, Hu F, Cui L, Swingle MR, Honkanen RE, Soltani P, Tissier R, Cohen MV, Downey JM. Cardioprotection by mild hypothermia during ischemia involves preservation of ERK activity. *Basic Res Cardiol*. 2011;106:421–430.
365. Ning X-H, Chi EY, Buroker NE, Chen S-H, Xu C-S, Tien Y-T, Hyyti OM, Ge M, Portman MA. 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.
366. Mochizuki T, Yu S, Katoh T, Aoki K, Sato S. Cardioprotective effect of therapeutic hypothermia at 34°C against ischaemia/reperfusion injury mediated by PI3K and nitric oxide in a rat isolated heart model. *Resuscitation*. 2012;83:238–242.
367. Tissier R, Couvreur N, Ghaleh B, Bruneval P, Lidouren F, Morin D, Zini R, Bize A, Chenoune M, Belair M-F, Mandet C, Douheret M, Dubois-Rande J-L, Parker JC, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Rapid cooling preserves the ischaemic myocardium against mitochondrial damage and left ventricular dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2009;83:345–353.
368. Tissier R, Chenoune M, Pons S, Zini R, Darbera L, Lidouren F, Ghaleh B, Berdeaux A, Morin D. Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes. *Resuscitation*. 2013;84:249–255.
369. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nat Rev Neurosci*. 2012;13:267–278.

370. Zhao H, Steinberg GK, Sapolsky RM. General versus specific actions of mild-moderate hypothermia in attenuating cerebral ischemic damage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1879–1894.
371. Kimura T, Sako K, Tanaka K, Kusakabe M, Tanaka T, Nakada T. Effect of mild hypothermia on energy state recovery following transient forebrain ischemia in the gerbil. *Exp Brain Res.* 2002;145:83–90.
372. Lo EH, Steinberg GK. Effects of hypothermia on evoked potentials, magnetic resonance imaging, and blood flow in focal ischemia in rabbits. *Stroke.* 1992;23:889–893.
373. Yenari M, Kitagawa K, Lyden P, Perez-Pinzon M. Metabolic downregulation: a key to successful neuroprotection? *Stroke.* 2008;39:2910–2917.
374. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature.* 1999;399:A7-14.
375. Colbourne F, Grooms SY, Zukin RS, Buchan AM, Bennett MVL. Hypothermia rescues hippocampal CA1 neurons and attenuates down-regulation of the AMPA receptor GluR2 subunit after forebrain ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:2906–2910.
376. Kataoka K, Yanase H. Mild hypothermia--a revived countermeasure against ischemic neuronal damages. *Neurosci Res.* 1998;32:103–117.
377. Hicks SD, Parmele KT, DeFranco DB, Klann E, Callaway CW. Hypothermia differentially increases extracellular signal-regulated kinase and stress-activated protein kinase/c-Jun terminal kinase activation in the hippocampus during reperfusion after asphyxial cardiac arrest. *Neuroscience.* 2000;98:677–685.
378. D’Cruz BJ, Logue ES, Falke E, DeFranco DB, Callaway CW. Hypothermia and ERK activation after cardiac arrest. *Brain Res.* 2005;1064:108–118.
379. Zhao H, Shimohata T, Wang JQ, Sun G, Schaal DW, Sapolsky RM, Steinberg GK. Akt contributes to neuroprotection by hypothermia against cerebral ischemia in rats. *J Neurosci.* 2005;25:9794–9806.
380. Zhang Z, Sobel RA, Cheng D, Steinberg GK, Yenari MA. Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res.* 2001;95:75–85.
381. Yenari MA, Iwayama S, Cheng D, Sun GH, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Chan PH, Steinberg GK. Mild hypothermia attenuates cytochrome c release but does not alter Bcl-2 expression or caspase activation after experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:29–38.

382. Phanithi PB, Yoshida Y, Santana A, Su M, Kawamura S, Yasui N. Mild hypothermia mitigates post-ischemic neuronal death following focal cerebral ischemia in rat brain: immunohistochemical study of Fas, caspase-3 and TUNEL. *Neuropathol.* 2000;20:273–282.
383. Fukuda H, Tomimatsu T, Watanabe N, Mu JW, Kohzuki M, Endo M, Fujii E, Kanzaki T, Murata Y. Post-ischemic hypothermia blocks caspase-3 activation in the newborn rat brain after hypoxia-ischemia. *Brain Res.* 2001;910:187–191.
384. Eberspächer E, Werner C, Engelhard K, Pape M, Gelb A, Hutzler P, Henke J, Kochs E. The effect of hypothermia on the expression of the apoptosis-regulating protein Bax after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2003;15:200–208.
385. Liu L, Kim JY, Koike MA, Yoon YJ, Tang XN, Ma H, Lee H, Steinberg GK, Lee JE, Yenari MA. FasL shedding is reduced by hypothermia in experimental stroke. *J Neurochem.* 2008;106:541–550.
386. Kim JY, Kim N, Lee JE, Yenari MA. Hypothermia Identifies Dynamin as a Potential Therapeutic Target in Experimental Stroke. *Ther Hypothermia Temp Manag.* 2017;7:171–177.
387. Ishikawa M, Sekizuka E, Sato S, Yamaguchi N, Inamasu J, Bertalanffy H, Kawase T, Iadecola C. Effects of moderate hypothermia on leukocyte-endothelium interaction in the rat pial microvasculature after transient middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 1999;30:1679–1686.
388. Wang GJ, Deng HY, Maier CM, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke. *Neuroscience.* 2002;114:1081–1090.
389. Choi JS, Park J, Suk K, Moon C, Park Y-K, Han HS. 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.
390. Kurisu K, Yenari MA. Therapeutic hypothermia for ischemic stroke; pathophysiology and future promise. *Neuropharmacology.* 2018;134:302–309.
391. Han HS, Karabiyikoglu M, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:589–598.
392. Deng H, Han HS, Cheng D, Sun GH, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation. *Stroke.* 2003;34:2495–2501.
393. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, Kurata K. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Crit Care Med.* 2002;30:1499–1502.

394. Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S. Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma*. 1999;16:225–232.
395. Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *J Neurochem*. 1995;65:1704–1711.
396. Globus MY, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation. *J Neurochem*. 1995;65:1250–1256.
397. Horiguchi T, Shimizu K, Ogino M, Suga S, Inamasu J, Kawase T. Postischemic hypothermia inhibits the generation of hydroxyl radical following transient forebrain ischemia in rats. *J Neurotrauma*. 2003;20:511–520.
398. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of mild hypothermia on superoxide anion production, superoxide dismutase expression, and activity following transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2002;11:28–42.
399. Yenari MA, Han HS. Influence of hypothermia on post-ischemic inflammation: role of nuclear factor kappa B (NFkappaB). *Neurochem Int*. 2006;49:164–169.
400. Liu L, Yenari MA. Therapeutic hypothermia: neuroprotective mechanisms. *Front Biosci*. 2007;12:816–825.
401. Lee JE, Yoon YJ, Moseley ME, Yenari MA. 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.
402. Nagel S, Su Y, Horstmann S, Heiland S, Gardner H, Koziol J, Martinez-Torres FJ, Wagner S. 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.
403. Xiao F, Arnold TC, Zhang S, Brown C, Alexander JS, Carden DL, Conrad SA. Cerebral cortical aquaporin-4 expression in brain edema following cardiac arrest in rats. *Acad Emerg Med*. 2004;11:1001–1007.
404. Nolan JP, Deakin CD, Soar J, Böttiger BW, Smith G, European Resuscitation Council. European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support. *Resuscitation*. 2005;67 Suppl 1:S39-86.
405. Belliard G, Catez E, Charron C, Caille V, Aegerter P, Dubourg O, Jardin F, Vieillard-Baron A. Efficacy of therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest due to ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2007;75:252–259.

406. Don CW, Longstreth WT, Maynard C, Olsufka M, Nichol G, Ray T, Kupchik N, Deem S, Copass MK, Cobb LA, Kim F. Active surface cooling protocol to induce mild therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest: a retrospective before-and-after comparison in a single hospital. *Crit Care Med*. 2009;37:3062–3069.
407. Storm C, Steffen I, Schefold JC, Krueger A, Oppert M, Jörres A, Hasper D. Mild therapeutic hypothermia shortens intensive care unit stay of survivors after out-of-hospital cardiac arrest compared to historical controls. *Crit Care*. 2008;12:R78.
408. Ferreira I, Schutte M, Oosterloo E, Dekker W, Mooi BW, Dambrink JHE, van 't Hof AWJ. Therapeutic mild hypothermia improves outcome after out-of-hospital cardiac arrest. *Neth Heart J*. 2009;17:378–384.
409. Testori C, Sterz F, Behringer W, Haugk M, Uray T, Zeiner A, Janata A, Arrich J, Holzer M, Losert H. Mild therapeutic hypothermia is associated with favourable outcome in patients after cardiac arrest with non-shockable rhythms. *Resuscitation*. 2011;82:1162–1167.
410. Vaahersalo J, Hiltunen P, Tainen M, Oksanen T, Kaukonen K-M, Kurola J, Ruokonen E, Tenhunen J, Ala-Kokko T, Lund V, Reinikainen M, Kiviniemi O, Silfvast T, Kuisma M, Varpula T, Pettilä V, FINNRESUSCI Study Group. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in Finnish intensive care units: the FINNRESUSCI study. *Intensive Care Med*. 2013;39:826–837.
411. Hachimi-Idrissi S, Corne L, Ebinger G, Michotte Y, Huyghens L. Mild hypothermia induced by a helmet device: a clinical feasibility study. *Resuscitation*. 2001;51:275–281.
412. Derwall M, Stoppe C, Brücken D, Rossaint R, Fries M. Changes in S-100 protein serum levels in survivors of out-of-hospital cardiac arrest treated with mild therapeutic hypothermia: a prospective, observational study. *Crit Care*. 2009;13:R58.
413. Oddo M, Schaller M-D, Feihl F, Ribordy V, Liaudet L. From evidence to clinical practice: effective implementation of therapeutic hypothermia to improve patient outcome after cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2006;34:1865–1873.
414. Dumas F, Grimaldi D, Zuber B, Fichet J, Charpentier J, Pène F, Vivien B, Varenne O, Carli P, Jouven X, Empana J-P, Cariou A. Is hypothermia after cardiac arrest effective in both shockable and nonshockable patients?: insights from a large registry. *Circulation*. 2011;123:877–886.
415. Mader TJ, Nathanson BH, Soares WE, Coute RA, McNally BF. Comparative Effectiveness of Therapeutic Hypothermia After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: Insight from a Large Data Registry. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2014;4:21–31.

416. Laurent I, Adrie C, Vinsonneau C, Cariou A, Chiche J-D, Ohanessian A, Spaulding C, Carli P, Dhainaut J-F, Monchi M. High-volume hemofiltration after out-of-hospital cardiac arrest: a randomized study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:432–437.
417. Kawahara F, Kadoi Y, Saito S, Goto F, Fujita N. Slow rewarming improves jugular venous oxygen saturation during rewarming. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2003;47:419–424.
418. Hildebrand F, van Griensven M, Giannoudis P, Luerig A, Harwood P, Harms O, Fehr M, Krettek C, Pape H-C. Effects of hypothermia and re-warming on the inflammatory response in a murine multiple hit model of trauma. *Cytokine*. 2005;31:382–393.
419. Alam HB, Rhee P, Honma K, Chen H, Ayuste EC, Lin T, Toruno K, Mehrani T, Engel C, Chen Z. Does the rate of rewarming from profound hypothermic arrest influence the outcome in a swine model of lethal hemorrhage? *J Trauma*. 2006;60:134–146.
420. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med*. 2009;37:S186-202.
421. Kliegel A, Janata A, Wandaller C, Uray T, Spiel A, Losert H, Kliegel M, Holzer M, Haugk M, Sterz F, Laggner AN. Cold infusions alone are effective for induction of therapeutic hypothermia but do not keep patients cool after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2007;73:46–53.
422. Larsson I-M, Wallin E, Rubertsson S. Cold saline infusion and ice packs alone are effective in inducing and maintaining therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Resuscitation*. 2010;81:15–19.
423. Merchant RM, Abella BS, Peberdy MA, Soar J, Ong MEH, Schmidt GA, Becker LB, Vanden Hoek TL. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: unintentional overcooling is common using ice packs and conventional cooling blankets. *Crit Care Med*. 2006;34:S490-494.
424. Hoedemaekers CW, Ezzahti M, Gerritsen A, van der Hoeven JG. Comparison of cooling methods to induce and maintain normo- and hypothermia in intensive care unit patients: a prospective intervention study. *Crit Care*. 2007;11:R91.
425. Lyden PD, Allgren RL, Ng K, Akins P, Meyer B, Al-Sanani F, Lutsep H, Dobak J, Matsubara BS, Zivin J. Intravascular Cooling in the Treatment of Stroke (ICTuS): early clinical experience. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2005;14:107–114.
426. Varon J, Acosta P, Wintz R, Mendoza N. Unusual side effect from hydrogel pads during therapeutic hypothermia. *Resuscitation*. 2008;78:248–249.
427. Gillies MA, Pratt R, Whiteley C, Borg J, Beale RJ, Tibby SM. Therapeutic hypothermia after cardiac arrest: a retrospective comparison of surface and endovascular cooling techniques. *Resuscitation*. 2010;81:1117–1122.

428. Deye N, Cariou A, Girardie P, Pichon N, Megarbane B, Midez P, Tonnelier J-M, Boulain T, Outin H, Delahaye A, Cravoisy A, Mercat A, Blanc P, Santré C, Quintard H, Brivet F, Charpentier J, Garrigue D, Francois B, Quenot J-P, Vincent F, Gueugniaud P-Y, Mira J-P, Carli P, Vicaut E, Baud FJ, Clinical and Economical Impact of Endovascular Cooling in the Management of Cardiac Arrest (ICEREA) Study Group. Endovascular Versus External Targeted Temperature Management for Patients With Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized, Controlled Study. *Circulation*. 2015;132:182–193.
429. Castrén M, Nordberg P, Svensson L, Taccone F, Vincent J-L, Desruelles D, Eichwede F, Mols P, Schwab T, Vergnion M, Storm C, Pesenti A, Pachi J, Guérisse F, Elste T, Roessler M, Fritz H, Durnez P, Busch H-J, Inderbitzen B, Barbut D. Intra-arrest transnasal evaporative cooling: a randomized, prehospital, multicenter study (PRINCE: Pre-ROSC IntraNasal Cooling Effectiveness). *Circulation*. 2010;122:729–736.
430. Kohlhauer M, Berdeaux A, Kerber RE, Micheau P, Ghaleh B, Tissier R. Liquid Ventilation for the Induction of Ultrafast Hypothermia in Resuscitation Sciences: A Review. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2016;6:63–70.
431. Vaicys V, Eason A, Schieber JD, Kulstad EB. Therapeutic hypothermia induction via an esophageal route--a computer simulation. *Am J Emerg Med*. 2012;30:932–935.
432. Kulstad E, Metzger AK, Courtney DM, Rees J, Shanley P, Matsuura T, McKnite S, Lurie K. Induction, maintenance, and reversal of therapeutic hypothermia with an esophageal heat transfer device. *Resuscitation*. 2013;84:1619–1624.
433. Tissier R, Ghaleh B, Cohen MV, Downey JM, Berdeaux A. Myocardial protection with mild hypothermia. *Cardiovasc Res*. 2012;94:217–225.
434. Tissier R, Hamanaka K, Kuno A, Parker JC, Cohen MV, Downey JM. Total liquid ventilation provides ultra-fast cardioprotective cooling. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:601–605.
435. Götberg M, Olivecrona GK, Engblom H, Ugander M, van der Pals J, Heiberg E, Arheden H, Erlinge D. 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.
436. Nozari A, Safar P, Stezoski SW, Wu X, Kostelnik S, Radovsky A, Tisherman S, Kochanek PM. Critical time window for intra-arrest cooling with cold saline flush in a dog model of cardiopulmonary resuscitation. *Circulation*. 2006;113:2690–2696.
437. Zhao D, Abella BS, Beiser DG, Alvarado JP, Wang H, Hamann KJ, Hoek TLV, Becker LB. 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.

438. Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleh B, Zini R, Dubois-Randé J-L, Carli P, Vivien B, Ricard J-D, Berdeaux A, Tissier R. Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in rabbits. *Circulation*. 2011;124:901–911.
439. Haugk M, Testori C, Sterz F, Uranitsch M, Holzer M, Behringer W, Herkner H, Time to Target Temperature Study Group. Relationship between time to target temperature and outcome in patients treated with therapeutic hypothermia after cardiac arrest. *Crit Care*. 2011;15:R101.
440. Scolletta S, Taccone FS, Nordberg P, Donadello K, Vincent J-L, Castren M. Intra-arrest hypothermia during cardiac arrest: a systematic review. *Crit Care*. 2012;16:R41.
441. Kim F, Nichol G, Maynard C, Hallstrom A, Kudenchuk PJ, Rea T, Copass MK, Carlbom D, Deem S, Longstreth WT, Olsufka M, Cobb LA. Effect of prehospital induction of mild hypothermia on survival and neurological status among adults with cardiac arrest: a randomized clinical trial. *JAMA*. 2014;311:45–52.
442. Lyon RM, Robertson CE, Clegg GR. Therapeutic hypothermia in the emergency department following out-of-hospital cardiac arrest. *Emerg Med J*. 2010;27:418–423.
443. Che D, Li L, Kopil CM, Liu Z, Guo W, Neumar RW. Impact of therapeutic hypothermia onset and duration on survival, neurologic function, and neurodegeneration after cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2011;39:1423–1430.
444. Suh GJ, Kwon WY, Kim KS, Lee HJ, Jeong KY, Jung YS, Lee JH. Prolonged therapeutic hypothermia is more effective in attenuating brain apoptosis in a Swine cardiac arrest model. *Crit Care Med*. 2014;42:e132-142.
445. Lee BK, Lee SJ, Jeung KW, Lee HY, Heo T, Min YI. Outcome and adverse events with 72-hour cooling at 32°C as compared to 24-hour cooling at 33°C in comatose asphyxial arrest survivors. *Am J Emerg Med*. 2014;32:297–301.
446. Kagawa E, Dote K, Kato M, Sasaki S, Oda N, Nakano Y, Miura K, Inoue I, Kihara Y. Do Lower Target Temperatures or Prolonged Cooling Provide Improved Outcomes for Comatose Survivors of Cardiac Arrest Treated With Hypothermia? *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e002123.
447. Kirkegaard H, Søreide E, de Haas I, Pettilä V, Taccone FS, Arus U, Storm C, Hassager C, Nielsen JF, Sørensen CA, Ilkjær S, Jeppesen AN, Grejs AM, Duez CHV, Hjort J, Larsen AI, Toome V, Tiainen M, Hästbacka J, Laitio T, Skrifvars MB. Targeted Temperature Management for 48 vs 24 Hours and Neurologic Outcome After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2017;318:341–350.

448. Cour M, Jahandiez V, Loufouat J, Ovize M, Argaud L. Minor Changes in Core Temperature Prior to Cardiac Arrest Influence Outcomes: An Experimental Study. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015;20:407–413.
449. Cour M, Abrial M, Jahandiez V, Loufouat J, Belaïdi E, Gharib A, Varennes A, Monneret G, Thibault H, Ovize M, Argaud L. Ubiquitous protective effects of cyclosporine A in preventing cardiac arrest-induced multiple organ failure. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117:930–936.
450. Abella BS, Zhao D, Alvarado J, Hamann K, Vanden Hoek TL, Becker LB. Intra-arrest cooling improves outcomes in a murine cardiac arrest model. *Circulation.* 2004;109:2786–2791.
451. Kofler J, Hattori K, Sawada M, DeVries AC, Martin LJ, Hurn PD, Traystman RJ. Histopathological and behavioral characterization of a novel model of cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice. *J Neurosci Methods.* 2004;136:33–44.
452. Bergt S, Güter A, Grub A, Wagner N-M, Beltschany C, Langner S, Wree A, Hildebrandt S, Nöldge-Schomburg G, Vollmar B, Roesner JP. Impact of Toll-like receptor 2 deficiency on survival and neurological function after cardiac arrest: a murine model of cardiopulmonary resuscitation. *PloS One.* 2013;8:e74944.
453. Minamishima S, Kida K, Tokuda K, Wang H, Sips PY, Kosugi S, Mandeville JB, Buys ES, Brouckaert P, Liu PK, Liu CH, Bloch KD, Ichinose F. Inhaled nitric oxide improves outcomes after successful cardiopulmonary resuscitation in mice. *Circulation.* 2011;124:1645–1653.
454. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248–254.
455. Ichas F, Jouaville LS, Sidash SS, Mazat JP, Holmuhamedov EL. Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signalling. *FEBS Lett.* 1994;348:211–215.
456. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdés I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1987;7:729–738.
457. Dietrich WD, Busto R, Valdes I, Loor Y. Effects of normothermic versus mild hyperthermic forebrain ischemia in rats. *Stroke.* 1990;21:1318–1325.
458. Wass CT, Lanier WL, Hofer RE, Scheithauer BW, Andrews AG. Temperature changes of > or = 1 degree C alter functional neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiology.* 1995;83:325–335.

459. Duncker DJ, Klassen CL, Ishibashi Y, Herrlinger SH, Pavek TJ, Bache RJ. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol*. 1996;270:H1189-1199.
460. Delbridge MS, Shrestha BM, Raftery AT, El Nahas AM, Haylor JL. The effect of body temperature in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2007;39:2983–2985.
461. Heijnen BH, van Veen SQ, Straatsburg IH, van Gulik TM. Pronounced effect of minor changes in body temperature on ischemia and reperfusion injury in rat liver. *J Appl Physiol (1985)*. 2001;91:265–268.
462. Sandroni C, Nolan J, Cavallaro F, Antonelli M. In-hospital cardiac arrest: incidence, prognosis and possible measures to improve survival. *Intensive Care Med*. 2007;33:237–245.
463. Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, Carey SM, Kaye W, Mancini ME, Nichol G, Lane-Truitt T, Potts J, Ornato JP, Berg RA, National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation Investigators. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. *JAMA*. 2006;295:50–57.
464. Chan PS, Rao SV, Bhatt DL, Rumsfeld JS, Gurm HS, Nallamothu BK, Cavender MA, Kennedy KF, Spertus JA. Patient and hospital characteristics associated with inappropriate percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:2274–2281.
465. Tian J, Kaufman DA, Zarich S, Chan PS, Ong P, Amoateng-Adjepong Y, Manthous CA, American Heart Association National Registry for Cardiopulmonary Resuscitation Investigators. Outcomes of critically ill patients who received cardiopulmonary resuscitation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:501–506.
466. Peres Bota D, Lopes Ferreira F, Mélot C, Vincent JL. Body temperature alterations in the critically ill. *Intensive Care Med*. 2004;30:811–816.
467. Arrich J, Holzer M, Havel C, Müllner M, Herkner H. Hypothermia for neuroprotection in adults after cardiopulmonary resuscitation. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2:CD004128.
468. Gill RS, Manouchehri N, Liu J-Q, Lee T-F, Cho WJ, Thiesen A, Churchill T, Bigam D, Cheung P-Y. Cyclosporine treatment improves cardiac function and systemic hemodynamics during resuscitation in a newborn piglet model of asphyxia: a dose-response study. *Crit Care Med*. 2012;40:1237–1244.
469. Gong P, Hua R, Zhang Y, Zhao H, Tang Z, Mei X, Zhang M, Cui J, Li C. Hypothermia-induced neuroprotection is associated with reduced mitochondrial membrane permeability in a swine model of cardiac arrest. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:928–934.

470. Huang C-H, Tsai M-S, Chiang C-Y, Su Y-J, Wang T-D, Chang W-T, Chen H-W, Chen W-J. Activation of mitochondrial STAT-3 and reduced mitochondria damage during hypothermia treatment for post-cardiac arrest myocardial dysfunction. *Basic Res Cardiol*. 2015;110:59.
471. Liu J, Wang Y, Zhuang Q, Chen M, Wang Y, Hou L, Han F. Protective effects of cyclosporine A and hypothermia on neuronal mitochondria in a rat asphyxial cardiac arrest model. *Am J Emerg Med*. 2016;34:1080–1085.
472. Cour M, Jahandiez V, Bochaton T, Venet F, Ovize M, Monneret G, Argaud L. Cyclosporine A prevents ischemia-reperfusion-induced lymphopenia after out-of-hospital cardiac arrest: A predefined sub-study of the CYRUS trial. *Resuscitation*. 2019;138:129–131.