



HAL
open science

Étude expérimentale de l'effet de l'hypothermie induite par ventilation liquide sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque

Emilie Boissady

► **To cite this version:**

Emilie Boissady. Étude expérimentale de l'effet de l'hypothermie induite par ventilation liquide sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2020. Français. NNT : 2020PESC0046 . tel-03557701

HAL Id: tel-03557701

<https://theses.hal.science/tel-03557701>

Submitted on 4 Feb 2022

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.

École Doctorale Science de la Vie et de la
Santé

Thèse

Présentée pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-EST

par

Emilie Boissady

Étude expérimentale de l'effet de
l'hypothermie induite par ventilation
liquide sur le syndrome inflammatoire
post-arrêt cardiaque

Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Soutenue le 24 novembre 2020, devant le jury suivant :

Rapporteur	Pr Guillaume Geri	(Université Paris-Saclay)
Rapporteur	Pr Catherine Marchand	(Université Paris-Descartes)
Examineur	Dr Nicolas Bréchet	(Sorbonne Université)
Examineur	Dr Martin Cour	(Université Claude Bernard Lyon 1)
Examineur	Pr Bijan Ghaleh	(Université Paris-Est Créteil)
Directeur de thèse	Pr Renaud Tissier	(École Nationale Vétérinaire d'Alfort)



Thèse effectuée au sein de **L'Institut Mondor de la Recherche Biomédicale**
Université Paris-Est Créteil

Remerciements

Le cheminement de la thèse de doctorat ne pourrait avoir lieu sans les rencontres qui s’y déroulent. Je souhaiterais ici mettre en avant certaines des personnes qui les ont incarnées et m’ont accompagné pour le meilleur et pour le pire durant cette tranche de vie. Néanmoins, l’entreprise n’est pas de toute simplicité, car parler des Hommes et de leurs maux est une chose, mais parler aux Hommes, d’autant plus lorsqu’on les estime, est un défi d’une autre envergure. Je ferai de mon mieux, pardonnez mes éventuelles maladresses.

J’adresse ainsi mes remerciements les plus sincères,

À Monsieur le professeur **Bijan Ghaleh**,

Pour m’avoir fait l’honneur de participer à ce jury de thèse,

Pour m’avoir ouvert les portes de son laboratoire,

Pour son expérience et ses hauteurs de vues qui m’ont permis de prendre un recul précieux lors de ce travail,

Pour ses conseils avisés et ses rappels bienveillants à la rigueur dispensés tout au long de ces 3 années.

À Madame le professeur **Catherine Marchand-Leroux**,

À Monsieur le professeur **Guillaume Geri**,

Pour m’avoir fait l’honneur de juger ce travail de thèse.

À Monsieur le docteur **Martin Cour**,

À Monsieur le docteur **Nicolas Bréchet**,

Pour m’avoir fait l’honneur d’examiner ce travail de thèse.

À Monsieur le professeur **Renaud Tissier**,

Pour avoir dirigé ces travaux,

Pour l’intérêt qu’il a su voir en moi,

Pour m’avoir donné un modèle à suivre d’excellence scientifique, mais aussi d’humanité,

Et bien sûr, pour sa bienveillance à l’égard de mes phrases souvent bien trop longues et alambiquées.

J’aurais aimé poursuivre ma route dans son sillage un peu plus longtemps.

À **Matthias**,

Pour m'avoir toujours montré la voie à suivre et pour son investissement à m'éduquer aux présentations de bon goût,
Pour sa ferveur à débattre et son exceptionnelle intelligence dont il est parfois difficile de se montrer à la hauteur,
Pour rendre toutes choses passionnantes, y compris les plus inattendues.

À **Fanny**,

Pour m'avoir patiemment enseigné tous les gestes qui m'ont permis d'accomplir ces travaux,
Pour m'avoir accompagné avec énergie et bonne humeur dans ces derniers et pour avoir su introduire un peu d'ordre lorsque l'éparpillement guettait.

À **Estelle**,

Pour sa chaleur et son enthousiasme, pour avoir été une formidable co-doctorante,
Pour avoir partagé une partie de mes joies, de mes craintes et quasiment l'intimité d'une chambre de congrès.
Les futurs étudiants trouveront en toi un guide sûr pour leurs premiers pas au laboratoire.

À **Agathe, Lina, Yaël, Quentin et Paul-Matthieu**, mes contemporains de paillasse et de bureau,

Pour avoir animé la vie du laboratoire, bien au-delà de la Science qui y est faite,
Pour leur humilité en dépit de leurs accomplissements,
Pour leur solidarité en toutes circonstances, avec une mention spéciale pour le groupe de l'ombre dénommé « aide lapins ».

À **Alain**,

Pour sa bonhomie et sa sérénité au quotidien dont j'essaierai de m'inspirer davantage à l'avenir,
Je regretterai toujours de n'avoir pu goûter ce fameux fare breton.

À **Lucien**,

Pour sa joie de vivre, un véritable îlot de réconfort.

Au docteur **Jin-Bo Su**, pour ses remarques pertinentes,

À **Juliette**, pour ses coups de main providentiels, mais aussi à tous les autres membres de l'équipe 3 dont j'aurais eu beaucoup à apprendre, le temps m'a malheureusement manqué.

À **Sophie Château-Joubert**, pour son aide précieuse dans la mise au point et la réalisation des analyses histologiques, fructueuses ou non.

Au terme de ce parcours, je remercie enfin tous les êtres, humains surtout, mais pas seulement, qui m'entourent et me sont chers. Mari, parents, amis, sans votre amour ce travail aurait bien peu de sens.

Table des matières

I	SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	1
1	Le syndrome post-arrêt cardiaque	3
A	Définition et enjeux du syndrome post-arrêt cardiaque	3
B	Physiopathologie générale des lésions cérébrales : l'encéphalopathie hypoxo-ischémique	8
1	Lésions non spécifiques d'ischémie-reperfusion	8
2	Éxcitotoxicité	12
3	Hyperhémie cérébrale, perte de l'autorégulation cérébrale et <i>no-reflow</i>	13
4	Altération de la barrière hémato-encéphalique et œdème cérébral	15
C	Rôle de l'inflammation dans la physiopathologie du syndrome post-arrêt	17
1	Initiation d'une réaction inflammatoire généralisée en conditions aseptiques : « the immune priming »	17
2	Spécificités de la neuro-inflammation	29
2	Stratégies neuroprotectrices en post-arrêt cardiaque	41
A	Le contrôle ciblé de la température, une stratégie neuroprotectrice de référence	41
1	Démonstration expérimentale de l'effet neuroprotecteur de l'hypothermie thérapeutique	41
2	Des bénéfices controversés sur la scène clinique	45
3	La ventilation liquide totale hypothermisante	50
B	Effet neuroprotecteur de stratégies immunomodulatrices	58
1	Inhibition ciblée de certains médiateurs de la réponse inflammatoire post-arrêt cardiaque	58
2	Effet de l'inhibition des évènements initiateurs de l'initiation de la réponse immune par les DAMPs	66

II	ÉTUDES EXPÉRIMENTALES	73
1	Matériel et méthodes	77
A	Conditions générales des expériences	77
1	Aspects réglementaires	77
2	Animaux	77
3	Protocoles anesthésiques	77
B	Modèle d'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale chez le porcelet	79
1	Préparation des animaux	79
2	Expériences préliminaires pour la mise au point du modèle	79
3	Anoxo-ischémie et procédure de réanimation	80
4	Paramètres étudiés	80
C	Modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez le lapin	83
1	Préparation chirurgicale	83
2	Arrêt cardiaque et réanimation	83
3	Paramètres mesurés	84
4	Évaluation de la perméabilité de la BHE	84
D	Analyse de la réponse inflammatoire chez le lapin	87
1	Dosages des médiateurs inflammatoires plasmatiques	87
2	Cytométrie en flux sur sang total	87
3	Cytométrie en flux sur tissu cérébral	88
E	Procédure de ventilation liquide totale	90
F	Analyses histologiques post-mortem	91
G	Analyses statistiques	92
2	Résultats	93
A	Évaluation des effets neuroprotecteurs d'une VLT hypothermisante au dé- cours de l'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale	93
1	Introduction	93
2	Protocole expérimental	95
3	Résultats	96
4	Commentaires	99
B	Étude des effet de la ventilation liquide totale hypothermisante sur la réponse inflammatoire post-arrêt cardiaque	117
1	Introduction	117
2	Protocole expérimental	118
3	Résultats	119
4	Commentaires	126
C	Étude du rôle de HMGB1 dans le syndrome post-arrêt cardiaque	171
1	Introduction	171
2	Protocole expérimental	172
3	Résultats	173

TABLE DES MATIERES

3 Discussion générale	183
Bibliographie	192

Liste des figures

1	Mortalité au décours d'un arrêt cardiaque	4
2	Phases du syndrome post-arrêt cardiaque	6
3	Accumulation de calcium intracellulaire lors d'ischémie	9
4	Évolution des dommages tissulaires au cours d'une ischémie-reperfusion	10
5	Physiopathologie de la mort cellulaire au décours d'une ischémie-reperfusion	11
6	Débits sanguins cérébraux chez le rat après un arrêt cardiaque asphyxique	14
7	Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique au décours d'un arrêt cardiaque	16
8	Recrutement neutrophilique et lymphopénie consécutifs à une ischémie cérébrale	19
9	Séquence des évènements inflammatoires à la suite d'une ischémie cérébrale	20
10	Réponse inflammatoire systémique chez les patients après un arrêt cardiaque	21
11	Activation de l'immunité innée à la suite de dommages tissulaires non septiques	21
12	Voies de signalisation activées par les <i>damage-associated molecular pattern</i>	23
13	Pathogenèse du syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque	24
14	Structure de la <i>High Mobility Group Box 1</i>	26
15	Effets de la libération de <i>High Mobility Group Box 1</i> dans le milieu extracellulaire	27
16	Activité de la <i>High Mobility Group Box 1</i> en fonction de son état d'oxydoréduction	28
17	Astroglie et activation de la microglie chez le rat suite à un arrêt cardiaque	31
18	Rôle de la microglie dans la réponse inflammatoire induite par une ischémie-reperfusion	32
19	Influx prédominant de lymphocytes T CD8 ⁺ dans le cerveau de souris après un arrêt cardiaque asphyxique	34
20	Influx prédominant de lymphocytes T CD4 ⁺ dans le cerveau de rats soumis à un arrêt cardiaque par administratio de KCl	34
21	Infiltration du cerveau par les cellules immunitaires périphériques dans le cerveau	36
22	Physiopathologie de la neuro-inflammation après une ischémie	39
23	Évaluation de l'effet du contrôle ciblé de la température sur la récupération neurologique après une ischémie cérébrale	43
24	Résultats des principaux cliniques sur le contrôle ciblé de la température après un arrêt cardiaque choquable	48

25	Relation entre la rapidité d'induction de l'hypothermie et le pronostic neurologique des patients après un arrêt cardiaque choquable et non choquable	49
26	Modalités de ventilation des alvéoles	52
27	Évolution de la vitesse de refroidissement par ventilation liquide totale en fonction de la température des perfluorocarbones	53
28	Vitesses de refroidissement dans les différents compartiments de l'organisme lors de ventilation liquide totale	54
29	Représentation du prototype Inolivent 5.0 et illustration de la neuroprotection obtenue dans un modèle expérimental d'arrêt cardiaque grâce à ce dispositif	56
30	Modélisation du prototype Inolivent 7.0	57
31	Mécanisme d'action des corticostéroïdes	59
32	Mécanisme d'action du Fingolimod	62
33	Illustration du protocole expérimental d'évaluation de l'effet du TNF utilisé par Lambertsen <i>et al</i>	64
34	Stratégies pharmacologiques d'inhibition de la <i>High Mobility Group Box 1</i> .	69
35	Structure de la glycyrrhizine	69
36	Préparation du Percoll pour l'isolement des cellules inflammatoires dans le cerveau	89
37	Protocole expérimental de l'évaluation de l'effet neuroprotecteur d'une ventilation liquide au décours d'un arrêt cardiaque pédiatrique	96
38	Évolution des températures et de la gazométrie après un épisode d'hypoxie-ischémie	97
39	Scores neurologiques des animaux au décours d'une encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale	98
40	Concentrations en PS100B après l'hypoxie-ischémie	98
41	Analyses histologiques de la dégénérescence neuronale après l'hypoxie-ischémie	99
42	Protocole expérimental de l'évaluation de l'effet de la ventilation liquide sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque	119
43	Effet de la ventilation liquide sur l'évolution des températures et des paramètres hémodynamiques après un arrêt cardiaque	120
44	Marqueurs de mortalité cellulaire précoce après un arrêt cardiaque	121
45	Effet de la ventilation liquide sur l'atteinte neurologique post-arrêt cardiaque	122
46	Infiltration du cerveau par les leucocytes sanguins	123
47	Effet de la ventilation liquide sur la réponse humorale post-arrêt cardiaque .	124
48	Effet de la ventilation liquide sur la réponse immunitaire cellulaire post-arrêt cardiaque	125
49	Étude <i>in vitro</i> de l'effet de l'hypothermie sur la réactivité des leucocytes sanguins	126
50	Expression sanguine de cytokines pro-inflammatoires chez des patients après un arrêt cardiaque extrahospitalier	127

51	Protocole expérimental de l'évaluation de l'effet de la glycyrrhizine sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque	173
52	Effet de la glycyrrhizine sur les paramètres sur les paramètres hémodynamiques après un arrêt cardiaque	174
53	Effet de la glycyrrhizine sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque	175
54	Effet de la glycyrrhizine sur l'atteinte neurologique post-arrêt cardiaque . .	177
55	Caractérisation de la neuro-inflammation induite par l'arrêt cardiaque . . .	178
56	Perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique induite par l'arrêt cardiaque	179
57	Effet neuroprotecteur du FPS-ZM1	181
58	Hypothèses sur les mécanismes de la protection médiée par l'hypothermie induite par ventilation liquide totale	186

Abréviations

- AMPA : acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ATP : adénosine tri-phosphate
AVC : accident vasculaire cérébral
BHE : barrière hémato-encéphalique
CCT : contrôle ciblé de la température
CPC : catégorie de performance cérébrale
CRF : capacité résiduelle fonctionnelle
DAMP : *damage-associated molecular pattern*
ECG : électrocardiogramme
ERO : espèces réactives de l'oxygène
EtCO₂ : *end-tidal CO₂*
FBS : *fetal bovine serum*
FiO₂ : fraction inspirée d'oxygène
FTY720 : *Fingolimod*
FV : fibrillation ventriculaire
HBSS : *Hanks' balanced salt solution*
HMGB1 : *high mobility group box 1*
HSP : *heat shock protein*
ICAM : *intercellular adhesion molecule*
IGF-1 : *insulin-like growth factor I*
IFN : interféron
IL : interleukine
LCS : liquide cérébro-spinal
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MCP : *monocyte chemoattractant protein*
MIP : *macrophage inflammatory protein*
MMP : métalloprotéinase matricielle
MO : moelle osseuse
NF- κ B : *nuclear factor- κ B*
NMDA : N-méthyl-D-aspartate
NO : monoxyde d'azote
PaCO₂ : pression artérielle partielle en CO₂
PaO₂ : pression artérielle partielle en O₂

PAM : pression artérielle moyenne
PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*
PEEP : *positive end expiratory pressure* (pression de fin d'expiration)
PEIP : *positive end inspiratory pressure* (pression de fin d'inspiration)
PFA : paraformaldéhyde
PFC : perfluorocarbones
PIC : pression intra-crânienne
PRR : *pattern-recognition receptor*
RACS : reprise de la circulation spontanée
RAGE : *receptor of advanced glycation end-products*
RCP : réanimation cardio-pulmonaire
RNL : ratio neutrophiles/lymphocytes
SDRA : syndrome de détresse respiratoire aiguë
SIRS : syndrome inflammatoires généralisé
SOD : superoxide dismutase
SpO₂ : saturation pulsée en O₂
TGF : *transforming growth factor*
TLR : *toll-like receptor*
TNF : *tumor necrosis factor*
VCAM : *vascular cell adhesion molecule*
VLP : ventilation liquide partielle
VLT : ventilation liquide totale
VMC : ventilation mécanique conventionnelle
XDH : xanthine déshydrogénase
XO : xanthine oxydase

Introduction

On dénombre chaque année en France environ 40 000 cas d'arrêt cardiaque extrahospitalier, aussi connu sous le terme de mort subite [1]. Du fait de la fréquence relativement élevée et de l'importance de cette atteinte cardiovasculaire, la prise en charge des patients réanimés constitue un enjeu majeur de santé publique. Or, depuis l'émergence des stratégies de réanimation cardio-pulmonaire (RCP) et la standardisation des premières procédures dans les années 1960, les conséquences de l'arrêt cardiaque sont restées relativement inchangées. Même dans les pays occidentaux, disposant désormais d'une chaîne de soin optimisée, le taux de mortalité associé à cette affection demeure tristement élevé. On estime que, *in fine*, moins de 5% des patients survivent plus de 3 mois avec une bonne récupération, compte tenu des séquelles neurologiques et multi-viscérales.

L'ensemble de ces complications contribue à la physiopathologie d'un véritable syndrome post-arrêt cardiaque, qui du fait de sa complexité, demeure encore relativement méconnue. Elles sont en partie attribuables à une activation intense et aspécifique du système immunitaire et au développement de troubles inflammatoires généralisés. Certains auteurs apparentent d'ailleurs ces désordres à ceux observés lors de choc septique et utilisent le terme de sepsis-like pour les désigner. Les tissus endommagés à la suite de l'ischémie-reperfusion libèrent en effet des signaux reconnus par les acteurs de l'immunité innée les *Damage-Associated Mediated Patterns* (DAMPs). S'engage alors une cascade pro-inflammatoire qui s'auto-entretient et contribue aux dommages retardés de l'ischémie. Si le rôle de ces molécules et de la neuro-inflammation est bien caractérisé dans l'ischémie cérébrale focale, il reste encore relativement inexploré dans l'arrêt cardiaque. Quelques études cliniques ont toutefois récemment mis en évidence une association étroite entre les niveaux plasmatiques de la *High Mobility Group Box 1* (HMGB1), un DAMP impliqué dans de nombreuses conditions inflammatoires, après la réanimation et le pronostic neurologique des patients [2, 3]. Cependant, malgré le rôle supposé des processus inflammatoires dans la pathogenèse des séquelles de l'arrêt cardiaque, les stratégies thérapeutiques basées sur leur modulation, comme l'administration de corticostéroïdes au décours de la réanimation, se sont révélées décevantes [4]. Face à ce constat, il pourrait être intéressant d'investiguer davantage les mécanismes mis en jeu au cours de la phase aiguë de la réponse inflammatoire initiée par l'arrêt cardiaque et, notamment le rôle des médiateurs ultra-précoces dans la mesure où ce sont eux qui semblent conditionner l'évolution des patients.

À l'heure actuelle, le contrôle thermique des patient entre 33 et 36°C reste la principale approche permettant d'améliorer la survie et le pronostic neurologique des patients au

décours d'un arrêt cardiaque, bien que les modalités d'induction et la température cible idéale soient encore débattues. Si de multiples études expérimentales montrent la supériorité d'une hypothermie modérée par rapport au maintien de la normothermie, cela est controversé sur la scène clinique. Un essai clinique d'envergure a en particulier conclu qu'une hypothermie modérée conférait une protection similaire à celle obtenue avec un contrôle thermique strict à 36°C [5]. Une des hypothèses avancées pour expliquer les discordances entre les études animales et cliniques concerne la différence de vitesse d'induction de l'hypothermie. Contrairement au refroidissement très rapide qui peut être induit avec les animaux de petite taille en expérimentation, les stratégies de refroidissement les plus efficaces nécessitent chez l'homme plusieurs heures pour atteindre la température de 32-34°C [6]. L'augmentation du délai d'induction de l'hypothermie après la réanimation pourrait ainsi être à l'origine d'une perte d'efficacité du traitement. Il existerait un temps-seuil, en-deçà duquel l'hypothermie inhiberait la phase précoce du syndrome post-arrêt cardiaque, et possiblement les éléments initiateurs de sa composante inflammatoire. Au-delà elle deviendrait inefficace. Afin d'investiguer cette hypothèse, le laboratoire dans lequel j'ai conduit mes travaux de thèse a mis au point un dispositif permettant d'induire une hypothermie généralisée extrêmement rapide par la ventilation liquide totale (VLT) des poumons avec des perfluorocarbones. Ces liquides permettent en effet d'exploiter le potentiel d'échangeur thermique des poumons, sans interférer avec les échanges gazeux respiratoires. Il a été démontré qu'une telle stratégie était capable d'induire un refroidissement ultra-rapide, dans tous les compartiments de l'organisme, indépendamment de la masse corporelle [7]. Le laboratoire a également montré que le refroidissement permis par la VLT induisait des effets cardio-, neuro- et néphroprotecteurs très supérieurs à ceux d'un suivi normotherme ou d'une hypothermie « traditionnelle » (couvertures froides et/ou perfusion de fluides froids) au décours d'un arrêt cardiaque chez le lapin [8, 9, 10, 11]. Ces effets étaient d'ailleurs associés à un blocage de la réponse inflammatoire systémique objectivable 8 h après l'arrêt [10], ce qui n'est pas le cas avec l'hypothermie telle qu'elle est utilisée en clinique [12]. Cela suggère bien montre bien que la susceptibilité à l'intervention thérapeutique est très brève et liée à des processus très précoces dans la mise en place du syndrome post-arrêt cardiaque.

Afin de changer le paradigme d'institution de l'hypothermie en transférant le refroidissement très rapide par VLT chez l'homme, le laboratoire d'accueil a contribué au développement technologique d'un prototype de ventilateur liquidien. L'enjeu est en effet de proposer un procédé de ventilation permettant de préserver au mieux l'architecture pulmonaire, afin de limiter les accidents observés lors de précédentes études avec d'autres modalités de ventilation liquide. Le laboratoire dispose ainsi aujourd'hui d'un procédé innovant et abouti. La poursuite du transfert clinique de la VLT nécessite toutefois encore de déterminer la fenêtre d'action de l'hypothermie, en établissant le lien avec les processus physiopathologiques propres à l'arrêt cardiaque. Pour cela, il nous semble crucial d'étudier spécifiquement le rôle des éléments déclencheurs de la réaction inflammatoire et notamment des DAMPs.

Au cours de ma thèse, l'objectif général était de documenter la composante inflammatoire du syndrome post-arrêt cardiaque et les effets de sa modulation, en étudiant l'effet de l'hypothermie, comme traitement neuroprotecteur de référence, mais aussi d'autres straté-

gies d'inhibition pharmacologiques ciblées sur les événements précoces. Avant de développer la méthode et les résultats obtenus au cours de ces études expérimentales, la première partie de ce manuscrit propose une synthèse bibliographique des principaux mécanismes physiopathologiques à l'origine des séquelles neurologiques de l'arrêt cardiaque, en développant tout particulièrement l'importance de sa composante inflammatoire. Cette synthèse présentera ensuite les principales approches disponibles ou envisagées afin d'intervenir sur ces mécanismes. Nous détaillerons ainsi l'état des connaissances, expérimentales et cliniques, sur l'hypothermie thérapeutique et nous présenterons les principes généraux de la VLT développée par le laboratoire et utilisée dans certaines des études de ce manuscrit. Enfin, nous terminerons en abordant les principales approches immunomodulatrices qui ont été investiguées pour prévenir les lésions d'ischémie-reperfusion. Au cours de ces travaux de thèse, nous avons conduit 3 études expérimentales successives. Nous avons tout d'abord défini les modalités de ventilation liquidienne permettant d'assurer la bonne tolérance pulmonaire de la procédure, et nous avons vérifié que ces modalités ne modifiaient pas son potentiel neuroprotecteur. Dans la seconde étude nous nous sommes intéressés au mécanisme par lequel l'hypothermie induite par VLT rapidement après la réanimation assurait une partie de ses effets neuroprotecteurs. L'objectif était notamment de préciser la fenêtre thérapeutique de l'hypothermie afin de contribuer à la validation préclinique de la stratégie de VLT développée par le laboratoire. Enfin, considérant l'importance des événements inflammatoires lors du syndrome post-arrêt cardiaque, une dernière étude a été réalisée afin d'évaluer le rôle spécifique de HMGB1 dans ce syndrome, comme médiateur de l'activation immunitaire. Pour cela nous avons évalué les effets de la glycyrrhizine, un inhibiteur pharmacologique de ce DAMP, sur la réponse inflammatoire et la récupération neurologique d'animaux soumis expérimentalement à un arrêt cardiaque.

PARTIE I:
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1

Le syndrome post-arrêt cardiaque

A. Définition et enjeux du syndrome post-arrêt cardiaque

L'arrêt cardiaque extrahospitalier constitue en enjeu majeur de santé publique dans les pays occidentaux du fait de la forte mortalité qui y est associée mais également des lourdes séquelles dont sont victimes les survivants. Sur les 275 000 victimes estimées chaque année en Europe, moins de 10% survivent *in fine* avec un bon pronostic neurologique, malgré un taux de reprise d'une activité cardiaque spontanée (RACS) d'environ 40% [13, 14], comme illustré par la Figure 1.

L'arrêt cardiaque marque en effet le point de départ de multiples complications qui sont à l'origine d'une mortalité à distance de la réanimation. Ces complications, qui surviennent après la RACS, sont réunies sous le terme de syndrome post-arrêt cardiaque et comprennent 4 composantes selon Nolan *et al.* [15] (Tableau 1). Il est ainsi possible de distinguer d'une part les conséquences généralisées des lésions d'ischémie-reperfusion, en particulier la mise en place d'un syndrome inflammatoires généralisé (SIRS), et les dommages spécifiques subis par le cerveau et le cœur, à l'origine de séquelles neurologiques irréversibles et d'une dysfonction myocardique transitoire. À ces éléments particuliers de physiopathologie initiés par l'arrêt cardiaque, s'ajoutent les atteintes préexistantes, et pouvant être à l'origine de l'arrêt. La sévérité de ce syndrome est ainsi très variable, et dépend notamment de la gravité initiale de l'ischémie (durée de *no-flow*, c'est-à-dire la période d'arrêt cardiaque sans débit présumé, et temps nécessaire pour obtenir la RACS, correspondant à la période de *low-flow*), de l'étiologie de l'arrêt (choquable ou non choquable), ainsi que de l'état de santé préalable du patient.

Le syndrome post-arrêt cardiaque respecte une cinétique bien particulière, qui peut être découpée en différentes phases sur la base de la progression des mécanismes physiopathologiques et des enjeux cliniques associés (Figure 2) [15, 16]. Les phases les plus précoces, qui s'étendent de la RACS à 72 h après l'arrêt, concentrent l'essentiel de la mortalité des patients. Il s'agit en effet d'une période au cours de laquelle les lésions initiées par l'arrêt cardiaque se poursuivent activement et contribuent à l'aggravation de l'état clinique des patients. La RACS marque ainsi le début d'une course contre la montre et les stratégies thérapeutiques ciblant les différents processus lésionnels doivent être initiées le plus précocement possible

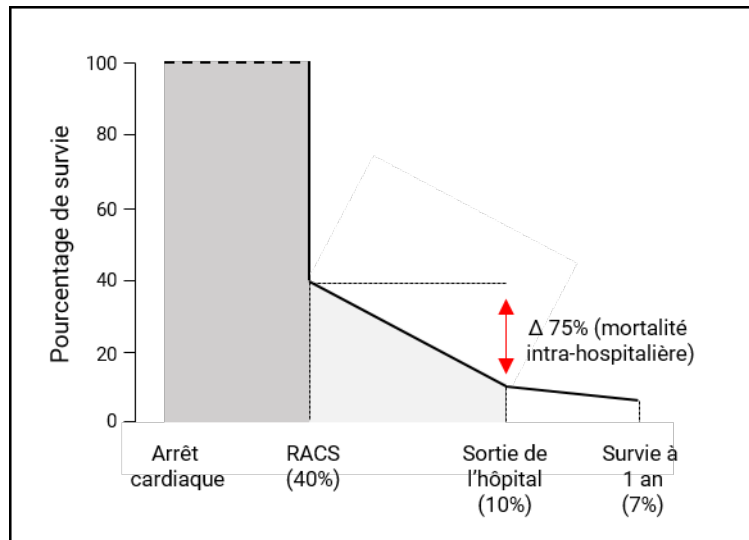


Figure 1: Représentation schématique de la mortalité des patients après un arrêt cardiaque, adapté d'après Kern *et al.* [14]
RACS, reprise d'une activité cardiaque spontanée

au cours de la phase précoce. Au-delà des 72 premières heures, une période de récupération débute, au cours de laquelle l'état des patients se stabilise et donne une idée plus fiable du pronostic final.

Les recommandations officielles en matière de réanimation cardio-pulmonaire (RCP) incluent depuis 1966 le traitement spécifique de ces conséquences à distance de l'arrêt cardiaque, après la RACS [17]. Néanmoins, depuis lors, si la prise en charge initiale des patients et l'optimisation des procédures de réanimation a permis de réduire la mortalité immédiate des patients, le pronostic de l'arrêt cardiaque après la RACS est quant à lui resté relativement inchangé.

L'une des premières études multicentriques sur la caractérisation des arrêts cardiaques intra-hospitaliers, publiée en 1953, montre que sur 672 patients réanimés avec succès, le taux de mortalité final était de 50% [18]. Plus de 50 ans plus tard, en 2009, une étude épidémiologique Américaine rapportait une mortalité intra-hospitalière de 57,8% chez des patients admis après un arrêt cardiaque extrahospitalier [19]. De même, dans le « National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation » (NRCPR), une base de donnée dans laquelle ont été recensés les arrêts cardiaques intra-hospitaliers survenus dans plus de 200 unités de réanimation différentes entre 2000 et 2009, seulement 37% des patients initialement réanimés ont survécu et ont pu sortir vivants de l'hôpital [20].

Il apparaît que la mortalité au décours du syndrome post-arrêt cardiaque est principalement d'origine neurologique. Dans une étude rétrospective multicentrique recoupant les données de mortalité chez des patients initialement réanimés après un arrêt cardiaque dans 11 unités de soins intensifs au Royaume-Uni entre 1998 et 2003, la dysfonction neurologique était à l'origine de 46% des décès, devant la défaillance multiviscérale (29,4%) et les troubles cardiovasculaires (24,6%). Cette étiologie neurologique est encore plus marquée dans le cas

	Physiopathologie	Manifestations cliniques
Atteinte neurologique post-AC	<ul style="list-style-type: none"> - Altération de l'autorégulation cérébrale - Œdème cérébral - Neurodégénérescence post-ischémique 	<ul style="list-style-type: none"> - Coma - Crises convulsives - Myoclonies - Dysfonction cognitive - Etat végétatif persistant ou mort cérébrale - Parkinsonisme secondaire (Infarctus médullaire ou cortical)
Dysfonction myocardique post-AC	<ul style="list-style-type: none"> - Hypokinésie globale (sidération myocardique) - Débit cardiaque réduit - Syndrome coronarien aigu 	<ul style="list-style-type: none"> - Hypotension - Arythmies - Défaillance cardiovasculaire
Réponses systémiques à l'I/R	<ul style="list-style-type: none"> - Syndrome inflammatoire systémique - Altération du contrôle de la vasomotricité - Coagulation accrue - Insuffisance surrénalienne - Altération de l'oxygénation tissulaire - Immunoparalysie et susceptibilité aux infections 	<ul style="list-style-type: none"> - Poursuite de l'hypoxie-ischémie tissulaire - Hypotension - Défaillance cardiovasculaire - Fièvre - Hyperglycémie - Défaillance multi-viscérale - Infection
Maladies causales, persistant après l'AC	<ul style="list-style-type: none"> - Maladie cardiovasculaire (syndrome coronarien, cardiopathie) - Maladie pulmonaire (BPCO, asthme) - Atteinte nerveuse centrale (AVC) - Maladie thromboembolique (embolie pulmonaire) - Infection (sepsis, pneumonie) - Hypovolémie (hémorragie, déshydratation) 	<p>Relative à l'étiologie, mais compliquée par le syndrome post-arrêt cardiaque concomitant</p>

Table 1: Principales composantes du syndrome post-arrêt cardiaque (D'après Nolan *et al.* [15])
AC, arrêt cardiaque ; AVC, accident vasculaire cérébral ; BPCO, bronchopneumopathie chronique obstructive ; I/R, ischémie-reperfusion

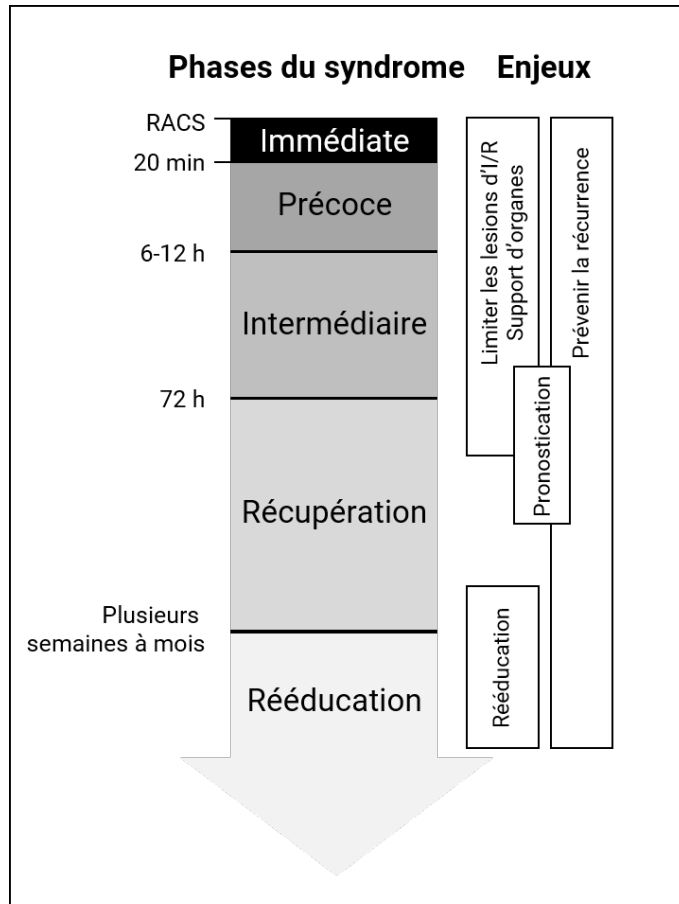


Figure 2: Représentation schématique des différentes phases du syndrome post-arrêt cardiaque et des enjeux cliniques associés, adapté d'après Nolan *et al.* [15] *RACS, reprise d'une activité cardiaque spontanée*

des arrêts cardiaques extrahospitaliers, pour lesquels elle était à l'origine de près de deux tiers des décès [21]. La neuroprotection est donc un aspect essentiel de la prise en charge des patients réanimés.

Par ailleurs, lorsque l'encéphalopathie post-arrêt cardiaque ne conduit pas à un état de mort cérébrale au cours de l'hospitalisation, elle est susceptible d'altérer de façon significative la qualité de vie des survivants. Par exemple, dans cette même étude britannique présentée ci-dessus, la moitié des patients sortis vivants de l'hôpital présentaient des séquelles neurologiques modérées à sévères (catégorie de performance cérébrale [CPC] > 1) [21]. De même, les données plus récentes du NRCPR révèlent que sur 6485 patients ayant survécu jusqu'à leur sortie de l'hôpital, 32% présentaient des séquelles neurologiques sévères [22].

Le manque de stratégies thérapeutiques efficaces pour prévenir la progression des lésions nerveuses nous a incité à focaliser notre étude sur la composante neurologique du syndrome post-arrêt cardiaque. Le cerveau présente en effet une fragilité toute particulière aux lésions d'ischémie-reperfusion, du fait de ses caractéristiques anatomiques et physiologiques. Par ailleurs, une partie des dommages cérébraux proviennent de mécanismes initiés à distance de l'organe. La compréhension de la physiopathologie des lésions cérébrales nécessite donc de prendre en compte les interactions entre les organes endommagés, notamment au travers du système immunitaire. Il est en effet désormais bien admis, que l'inflammation joue un rôle essentiel dans la genèse des séquelles neurologiques après un arrêt cardiaque.

B. Physiopathologie générale des lésions cérébrales : l'encéphalopathie hypoxo-ischémique

La physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque ayant déjà fait l'objet d'une description exhaustive dans des travaux de thèse antérieurs du laboratoire, les mécanismes généraux des lésions d'ischémie-reperfusion ne seront évoqués ici que brièvement afin de concentrer le propos sur la composante inflammatoire du syndrome, sur laquelle nous avons également focalisé nos travaux expérimentaux

1 Lésions non spécifiques d'ischémie-reperfusion

Au décours de l'arrêt cardiaque, deux périodes d'altération de la perfusion tissulaire peuvent être distinguées, chacune d'entre elle contribuant de manière unique aux processus d'ischémie-reperfusion et à la complexité du syndrome post-arrêt cardiaque. Dans un premier temps, avant la mise en œuvre d'un massage cardiaque, le *no-flow* correspond à une interruption totale de la circulation sanguine, puis la période de *low-flow* initiée par la RCP, correspond à une perfusion limitée des organes avec du sang appauvri en oxygène. La RACS et la reperfusion sont ensuite à l'origine d'une seconde vague lésionnelle, caractérisée principalement par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les mécanismes cellulaires des lésions d'ischémie-reperfusion sont globalement similaires entre les différents organes et mettent en jeu une cascade complexe d'évènements, qui évoluent au cours du temps.

1.1 **Modalités de la mort neuronale dans le contexte d'une ischémie globale : les lésions cellulaires résultent de mécanismes multimodaux**

Une partie de la mortalité neuronale qui survient en post-arrêt cardiaque découle des mêmes processus initiés dans les autres types cellulaires. Ces processus se mettent en place très rapidement après le début de l'arrêt cardiaque. Durant les premières minutes de l'ischémie, sous l'effet de la privation prolongée en oxygène, le métabolisme énergétique cellulaire est dévié vers la voie anaérobie. Il se produit alors une déplétion rapide des stocks cellulaires d'adénosine tri-phosphate (ATP; inhibition de la phosphorylation oxydative) et une acidification du milieu intracellulaire sous l'effet de l'accumulation d'acide lactique. Dans ces conditions, le fonctionnement des transporteurs membranaires est altéré, et les cellules sont le siège de déséquilibres ioniques majeurs, en particulier d'une augmentation des concentrations intracellulaires en Ca^{2+} . Ces phénomènes sont illustrés schématiquement par la Figure 3 [23]. Des mesures réalisées *in vivo* ont montré que la concentration calcique cytosolique des neurones était multipliée par un facteur 1000 au bout de 8 min d'ischémie cérébrale globale [24]. Les conséquences de la surcharge calcique sur la machinerie cellulaire sont multiples et délétères. Elle active notamment toute une série d'enzymes responsables de processus de lipolyse, de protéolyse, de dégradation de l'ADN et de production de monoxyde d'azote (NO), qui contribuent directement à la dégradation de l'ultrastructure cellulaire et à la nécrose tissulaire [25, 26]. L'ischémie contribue également à l'ouverture

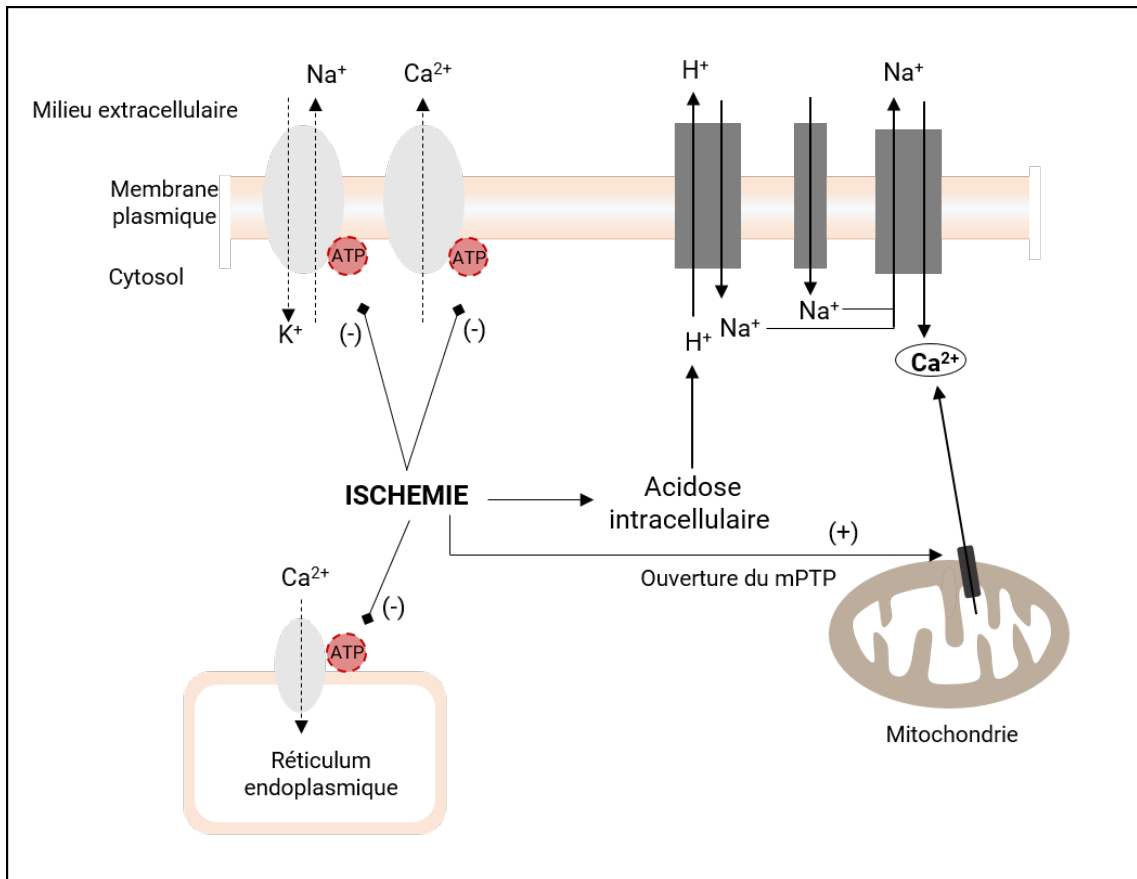


Figure 3: Représentation schématique de l'effet de l'ischémie sur la concentration intracellulaire en calcium (adapté d'après Kalogeris *et al.* [23])
mPTP, pore de transition de perméabilité mitochondriale

du pore de transition de perméabilité mitochondriale, dissipant ainsi le potentiel de membrane mitochondrial, ce qui aggrave encore l'altération de la production d'ATP. D'autres phénomènes initiés par la surcharge calcique ne contribuent pas directement aux lésions ischémiques *sensu stricto* mais préparent le terrain à une exacerbation des événements délétères qui surviennent au cours de la reperfusion. Par exemple, l'accumulation du calcium intracellulaire induit l'activation de protéases qui convertissent la xanthine déshydrogénase, une enzyme qui assure la dégradation des bases puriques et de leurs dérivés, en xanthine oxydase (XO), source majeure d'anion superoxyde lors de la reperfusion [27]. L'activité de la XO est ainsi augmentée de 50% dans le cortex rénal de rats soumis à 30 min d'ischémie rénale [28].

Au moment de la reperfusion, le rétablissement brutal de l'approvisionnement en oxygène, dans un contexte de défenses anti-oxydantes affaiblies par la déplétion énergétique consécutive à l'ischémie, s'accompagne de la production massive d'ERO. Une partie de ces réactifs sont produits par des enzymes déjà actives en conditions physiologiques comme la XO [29], mais des voies oxydantes spécifiques sont aussi activées au cours de l'ischémie. Par exemple, en condition ischémique, la chaîne respiratoire mitochondriale présente une altération de son fonctionnement caractérisée par la modification de l'activité du complexe II. Au lieu de

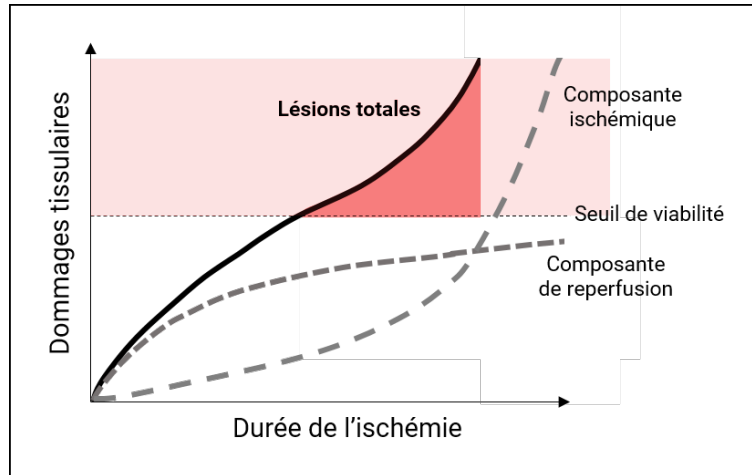


Figure 4: Illustration de la contribution relative des différentes composantes lésionnelles lors d'ischémie-reperfusion au cours d'une ischémie prolongée (adapté d'après Kalogeris *et al.* [23])

transformer le succinate en fumarate pour alimenter le cycle de Krebs, ce dernier se met à consommer le fumarate pour produire du succinate qui s'accumule alors dans les cellules. Lors de la reperfusion, la reprise de la consommation du succinate accumulé en grande quantité s'accompagne d'un transfert d'électron du complexe II vers le complexe I. Ce phénomène de retour électronique est alors à l'origine de la production d'anion superoxyde par le complexe I [30].

L'accumulation d'ERO en grande quantité dans le milieu intracellulaire favorise la formation de radicaux libres qui participent ensuite à des réactions d'oxydation cellulaire qui s'auto-amplifient [31]. La synergie lésionnelle qui existe entre les phases d'ischémie et de reperfusion est illustrée par la Figure 4. On observe en effet que les lésions liées à la reprise de la circulation sont bien initiées en même temps que les lésions ischémiques *per se*, par le biais de modifications biochimiques qui préparent la vague de génération d'ERO.

Ce maelstrom de réponses cellulaires délétères (synthétisées par la Figure 5) engage rapidement les cellules dans des voies de dégénérescence. Une nécrose neuronale étendue, est en effet objectivable dans les heures qui suivent l'arrêt cardiaque [32, 33]. Cette modalité de mort cellulaire survient alors même que les durées d'ischémie sont relativement courtes en comparaison à ce qui peut être observé lors d'accident vasculaire cérébral (AVC). Le caractère systémique de l'ischémie-reperfusion semble donc aggraver la mortalité cellulaire qui en découle. Des voies de mort cellulaires programmées telles que l'apoptose ou l'autophagie sont également activées après l'arrêt cardiaque [34].

Une autre particularité des lésions d'ischémie-reperfusion concerne l'existence d'un délai potentiellement assez long entre l'atteinte initiale et la finalisation des dommages cellulaires. La mortalité cellulaire s'étend en effet sur une période très variable, pouvant aller de quelques heures à quelques jours. Chez l'homme, les premiers signes de mort cellulaire sont visibles dans le néocortex à partir de 5 h post-arrêt, et la mortalité se poursuit encore pendant 7 jours dans les neurones de la région CA1 de l'hippocampe [33]. De même,

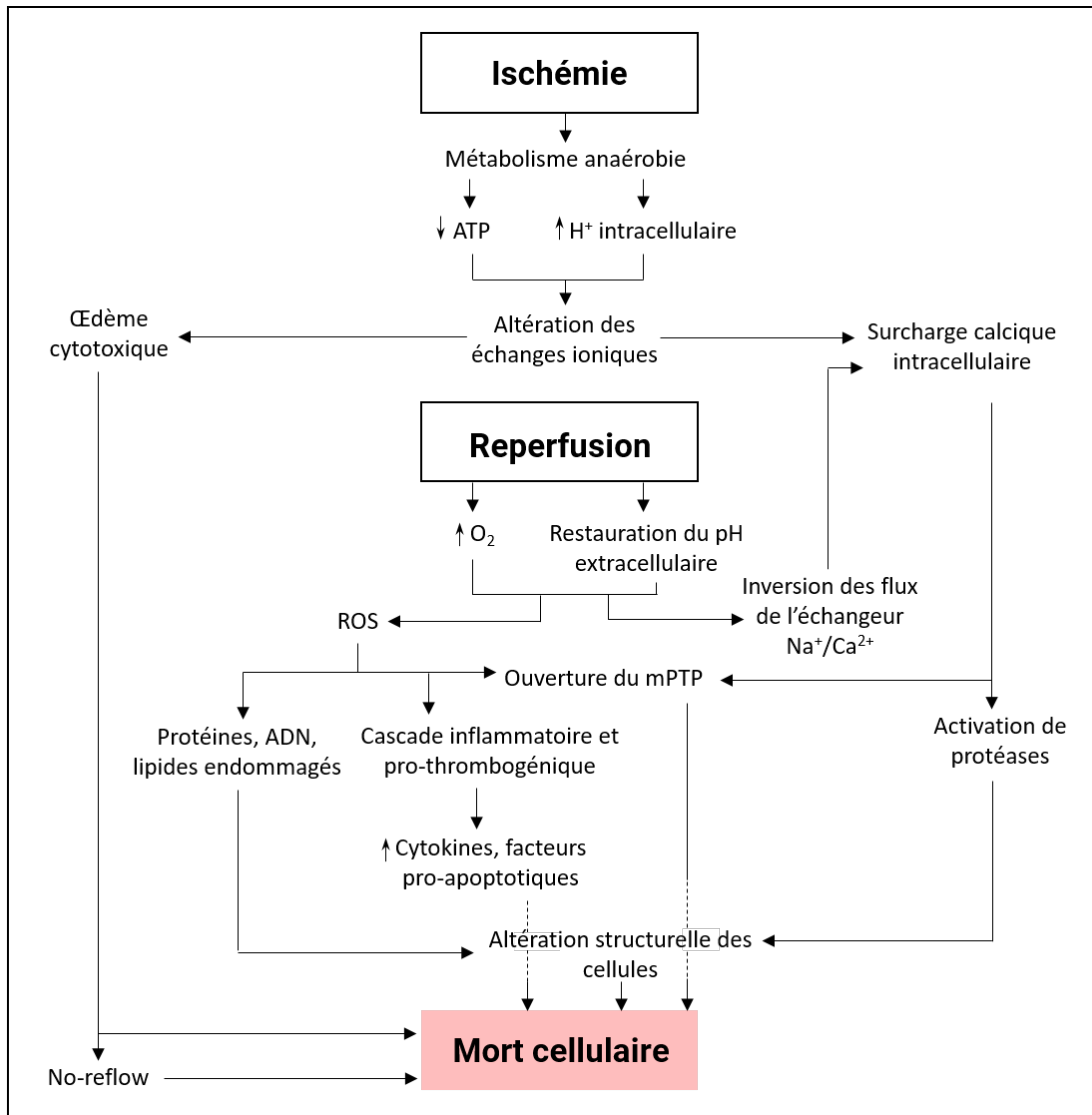


Figure 5: Représentation schématisée des différents mécanismes de mort cellulaire après une ischémie-reperfusion (D'après Kalogeris *et al.* [23])

chez des rats soumis à 10 min d'arrêt cardiaque induit par fibrillation ventriculaire (FV), l'observation des neurones par microscopie électronique a permis de mettre en évidence des altérations morphologique sur près de 20% des neurones de la région CA3 de l'hippocampe 24 h après la RACS sans baisse significative de la densité neuronale. En revanche, au 3^{ème} jour de suivi, l'analyse de cette même région révélait une baisse de 30% de la densité neuronale [35]. Ces travaux illustrent le caractère évolutif des lésions au cours de la période de reperfusion et le concept de mort neuronale retardée, développé pour la première fois chez le rat par Pulsinelli et Brierly [36]. D'un point de vue mécanistique, cette mortalité à distance peut s'expliquer en partie par la stimulation des voies de l'apoptose. Les dommages mitochondriaux favorisent par exemple l'expression de gènes pro-apoptotiques comme Bcl-2 ou Bax. De même, la libération de cytochrome C par les mitochondries endommagées peut entrer dans la constitution d'apoptosome participant à la cascade d'activation des caspases [37].

L'étalement des dommages cellulaires dans le temps après l'arrêt cardiaque laisse suggérer une large fenêtre thérapeutique pour prévenir la mort neuronale. Toutefois, comme illustré par la Figure 4, les interventions doivent tout de même avoir lieu avant que les dommages tissulaires totaux n'atteignent un seuil critique et affectent la viabilité de l'organe.

1.2 Origine de la vulnérabilité des neurones

Le cerveau semble présenter une vulnérabilité toute particulière dans le contexte de l'ischémie-reperfusion généralisée par rapport aux autres organes. Cela peut s'expliquer tout d'abord par sa mauvaise tolérance à l'ischémie : 5 min d'arrêt circulatoire suffisent à induire une mortalité neuronale dans plusieurs régions du cerveau alors qu'il faut maintenir l'ischémie pendant au moins 20 à 40 min pour observer des effets similaires sur le rein ou le cœur [38]. Cette sensibilité provient en partie de son activité métabolique exceptionnelle. Le cerveau est en effet responsable à lui seul de près du quart de la consommation totale en oxygène de l'organisme. De plus, les neurones dépendent quasi-exclusivement du glucose comme substrat énergétique et il n'existe pas de réserves cérébrales de ce métabolite [23]. Ainsi, toute situation d'altération de l'approvisionnement en oxygène ou en glucose est critique pour cet organe. Le cerveau est également très exposé aux lésions de reperfusion. Les défenses antioxydantes y sont en effet peu développées, comme l'indique le faible niveau d'activité d'enzymes telles que la superoxyde dismutase (SOD) ou la glutathion peroxydase dans ce tissu [39]. Les cellules nerveuse sont également très riches en acide gras polyinsaturés, les rendant particulièrement sensibles aux réactions d'oxydation [40]. Par ailleurs, le cerveau est le siège de mécanismes physiopathologiques uniques suite à la reprise de la circulation, tels que l'excitotoxicité, comme nous le verrons ci-dessous.

2 Excitotoxicité

Une des réponses « neuro-spécifiques » repose sur la libération massive de certains neurotransmetteurs qui exercent un effet cytotoxique propre. Ce phénomène qualifié d'excitotoxicité a été décrit dès 1969 par Olney *et al.* pour expliquer la propagation des lésions ischémiques cérébrales [41]. En conditions anoxique, la dépolarisation membranaire

neuronale provoquée par la redistribution ionique, déclenche en effet le relargage brutal et dérégulé du contenu des vésicules pré-synaptiques. Un des principaux neurotransmetteurs excitatoires, le glutamate, s'accumule ainsi dans l'espace post-synaptique et atteint des concentrations proches du millimolaire [38]. Lors d'ischémie, l'accumulation du glutamate est d'ailleurs aggravé par l'inhibition de sa recapture par les astrocytes. La surcharge de glutamate entraîne une stimulation excessive de ses récepteurs membranaires couplés à des canaux ioniques, en particulier les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA), et alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA). En réponse à cette exposition brève et intense de glutamate, les récepteurs génèrent un influx supplémentaire de Na^+ et Ca^{2+} dans les neurones, qui s'ajoute à celui initialement médié par la déplétion énergétique (i.e., par les canaux Ca^{2+} voltages dépendants ou l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Les voies physiopathologiques activées par l'augmentation du calcium libre intracellulaire précédemment décrites sont ainsi renforcées dans les neurones. Néanmoins, dans le contexte de l'arrêt cardiaque, l'excitotoxicité du glutamate semble majoritairement médiée par son action sur les récepteurs AMPA plutôt que NMDA, contrairement à ce qui est observé dans des modèles de trauma ou d'ischémie cérébrale focale [38].

L'excitotoxicité constitue ainsi la source principale des lésions cérébrales au cours de la phase aigüe de l'arrêt cardiaque, c'est-à-dire dans les premières minutes à heures suivant la réanimation [37].

3 Hyperhémie cérébrale, perte de l'autorégulation cérébrale et *no-reflow*

Un autre élément de fragilité du tissu cérébral concerne les désordres hémodynamiques dont il fait l'objet immédiatement après l'ischémie-reperfusion. En conditions normales le flux sanguin cérébral est finement régulé, indépendamment des variations de pression qui se produisent dans la circulation périphérique, grâce à un système de modulation des résistances vasculaires. Or, il apparaît que ces mécanismes de régulation de la perfusion cérébrale sont durablement altérés à la suite de l'arrêt cardiaque. Par exemple, une étude a évalué l'autorégulation cérébrale en mesurant les variations du flux sanguin dans l'artère cérébrale moyenne par Doppler transcranien en réponse aux modifications de la pression artérielle induite par administration d'adrénaline chez 18 patients réanimés des suites d'un arrêt cardiaque. Elle a ainsi montré que l'autorégulation était absente ou profondément altérée chez 13 d'entre eux [42]. L'arrêt cardiaque est donc à l'origine d'un état précaire transitoire dans lequel le cerveau n'est plus protégé des variations hémodynamiques globales. Par ailleurs, même en conditions normotensives, le cerveau est le siège d'une séquence d'évènements hémodynamiques dont les conséquences sont encore méconnues. Des travaux menés chez le rat dans un modèle d'arrêt cardiaque induit par administration intraveineuse de KCl ont montré que le cerveau fait l'objet d'une hyperhémie globale et marquée, dans les 30 premières minutes qui suivent la RACS. Les différentes régions cérébrales étudiées présentaient toutes une élévation du débit sanguin de 230 à 350% par rapport aux valeurs basales [43]. Cette hyperhémie transitoire semble résulter d'une vasoplégie induite par l'acidose métabolique [44]. Si sa contribution au syndrome post-arrêt cardiaque reste à préciser, des travaux tendent à montrer qu'elle est bien à l'origine d'une aggravation des

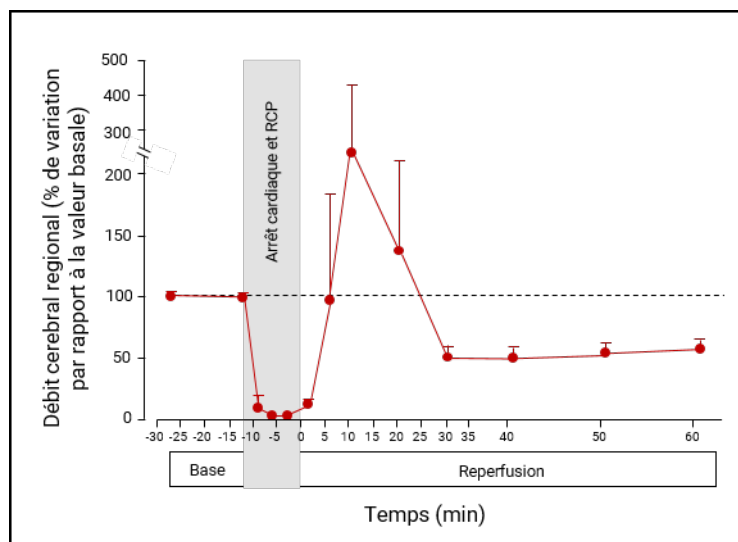


Figure 6: Évolution du débit cérébral régional en post-arrêt cardiaque dans les expériences menées par Noppens *et al.* [52]

Dans cette étude, des rats ont été soumis à 9 min d'arrêt cardiaque asphyxique suivies d'une réanimation cardio-pulmonaire. Le débit cérébral est exprimé en pourcentage de variation par rapport à la valeur initiale (base)

lésions d'ischémie-reperfusion. Certains traitements ayant pour effet de réduire cette phase hyperhémique sont par exemple associés à une meilleure récupération neurologique [45].

L'hyperhémie réactionnelle est suivie par une période plus longue d'hypoperfusion cérébrale globale, dont la sévérité est indépendante de la durée de l'ischémie initiale [46]. Le débit cérébral chute alors de près de 50% de sa valeur basale et cette baisse persiste généralement pendant 72 h après l'arrêt cardiaque. Les variations du débit cérébral après un arrêt cardiaque sont illustrées par la Figure 6 qui présente les résultats d'une étude menée sur des rats soumis à 9 min d'asphyxie. L'hypoperfusion s'explique en partie par la survenue de désordres microcirculatoires, caractérisés par des phénomènes focaux de *no-reflow*. Suite à la RACS, certains territoires restent en effet localement pas ou peu perfusés, ce qui contribue directement à l'extension des lésions d'ischémie. Ce phénomène initialement décrit dans le contexte de l'ischémie régionale a également été mis en évidence dans des modèles d'arrêt cardiaque. Toutefois, les manifestations du *no-reflow* ne sont durables que pour des durées de *no-flow* supérieures à 5 min [47]. Les causes de ces occlusions capillaires disséminées sont variées et ne mettent pas uniquement en jeu des processus thrombotiques. Les stratégies ciblant les mécanismes du *no-reflow* ont montré des effets bénéfiques dans divers modèles expérimentaux d'arrêt cardiaque [48, 49, 50]. Toutefois, leur importance reste à confirmer chez l'homme. Par exemple, la normalisation du débit cérébral des patients au cours de la phase de reperfusion grâce à la nimodipine, un inhibiteur des canaux calciques, n'était pas associée à une amélioration du pronostic neurologique [51].

4 Altération de la barrière hémato-encéphalique et œdème cérébral

Les neurones ne sont pas les seules cellules contribuant à la spécificité de la physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale. La dysfonction des autres composantes de l'unité neurovasculaires participe également à l'aggravation des lésions cellulaires. Il a en effet été démontré que l'arrêt cardiaque s'accompagnait d'une perméabilisation précoce de la barrière hémato-encéphalique (BHE), dans les 24 premières heures suivant la RACS [53]. La cinétique de cette perméabilisation est peu documentée en post-arrêt cardiaque. Néanmoins, il a été montré expérimentalement sur des porcs qu'elle se mettait en place dès 30 min après l'arrêt cardiaque [54], et persistait ensuite durablement. Dans un autre modèle porcin avec une durée de *no-flow* un peu plus courte, la perméabilisation de la BHE était en effet encore identifiée 24 h après la RACS [55]. Certains travaux semblent indiquer que l'ouverture la BHE après l'arrêt cardiaque serait biphasique, à l'image de ce qui est observé dans les modèles d'ischémie régionale [56]. Afin d'évaluer l'évolution de la perméabilité de la BHE après un arrêt cardiaque, Pluta *et al.* ont administré de la « horseradish peroxidase » (HRP) à des rats par voie intraveineuse à différent temps après la RACS et ont ensuite quantifié le passage intracérébral de la protéine par microscopie électronique [57]. Les expérimentateurs ont ainsi observé une première phase transitoire d'ouverture de la BHE immédiatement après la RACS. En revanche la HRP n'était pas retrouvée dans le cerveau lorsqu'elle était administrée 3 h après l'arrêt. L'ouverture de la BHE était de nouveau objectivée à partir de 6 h post-arrêt, et jusqu'à 24 h après. Cette étude suggère ainsi que la BHE subit une première altération précoce mais rapidement réversible au décours de l'arrêt cardiaque, et qu'une seconde vague lésionnelle au cours de la reperfusion contribue à une réouverture tardive et plus durable.

L'ouverture de la BHE est médiée par divers mécanismes affectant les différents constituants de l'unité neurovasculaire, synthétisés en partie par la Figure 7. Par exemple, les jonctions serrées localisées entre les cellules endothéliales jouent un rôle primordial dans la restriction des flux paracellulaires au niveau des capillaires cérébraux. Or, il a été montré *in vivo* que l'ischémie cérébrale régionale s'accompagne d'une diminution de ces complexes jonctionnels [56]. Une étude menée dans un modèle porcin, a montré que l'arrêt cardiaque était également associé à une baisse de l'expression de l'occludine et de la claudine-5 en région corticale 24 h après la RACS [55]. Ce phénomène est accru par l'activation de metalloprotéinases, qui dégradent également les protéines constitutives des membranes basales des capillaires, favorisant le développement d'un œdème vasogénique. Une étude menée chez 51 patients initialement réanimés, a montré une élévation des concentrations sériques en metalloprotéinase matricielle (MMP)-7, -8 et -9 durant les 48 premières heures de suivi [58]. La neuro-inflammation initiée par l'ischémie-reperfusion joue aussi un rôle central dans l'ouverture de la BHE. La microglie, les astrocytes périvasculaires ainsi que les cellules endothéliales activées produisent notamment de multiples chimiokines et cytokines qui stimulent la migration des leucocytes périphériques à travers la BHE [59, 60, 61]. Des études *in vitro*, ont montré que le tumor necrosis factor (TNF), l'interferon (IFN)- γ , l'interleukine (IL)-1, ou encore l'IL-6 produits dans ces conditions contribuaient à la dégradation des

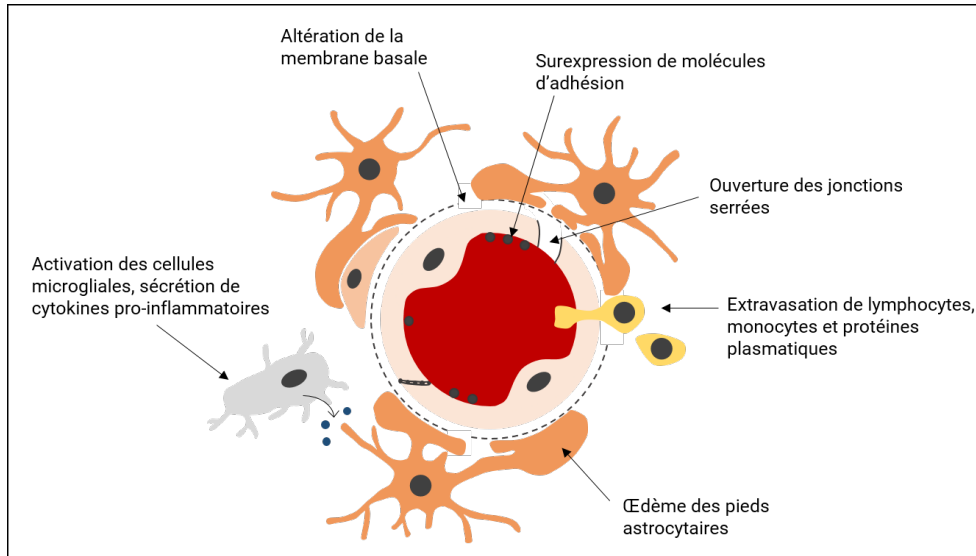


Figure 7: Représentation schématique des mécanismes de perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique au décours de l'arrêt cardiaque (D'après Kaur *et al.* [63])

jonctions serrées [62].

La perte d'intégrité de la BHE s'accompagne d'une modification du milieu interstitiel et de son potentiel osmotique, favorisant l'influx d'eau dans le compartiment périvasculaire [64]. L'œdème vasogénique qui en résulte contribue à la formation d'un œdème cérébral diffus, pouvant secondairement exacerber la mort neuronale et amplifier les désordres hémodynamiques présentés plus haut. Des études cliniques ayant évalué la formation d'œdème cérébral après l'arrêt cardiaque par tomодensitométrie confirment qu'il s'agit d'un évènement fréquent et précoce chez les patients réanimés [65, 66, 67]. Sa survenue est d'ailleurs plus fréquente lors d'arrêt cardiaque d'origine asphyxique, et concerne alors près de 80% des patients contre 30% dans les études portant sur les arrêts de cause cardiaque primaire [68, 69].

L'encaissement de l'encéphale dans la boîte crânienne le rend beaucoup plus sensible que les autres organes aux augmentations de volumes, même minimales. Ainsi, l'œdème cérébral est susceptible de s'accompagner d'une élévation néfaste de la pression intracrânienne (PIC) pouvant, dans les cas extrêmes, entraîner une herniation. De façon plus subtile, l'hypertension intracrânienne peut aussi contribuer à aggraver les désordres hémodynamiques présentés plus haut, et notamment accentuer l'hypoperfusion cérébrale par augmentation des résistances et de la dysfonction microvasculaire. Néanmoins, l'œdème cérébral post-arrêt cardiaque semble rarement associé à une élévation significative de la PIC. Par exemple, dans une étude menée sur 6 patients, aucune élévation notable de la PIC n'a été rapportée, à l'exception d'un patient ayant présenté des troubles convulsifs [70]. Ainsi il n'existe pas de preuve directe que l'œdème cérébral secondaire accroît la sévérité de l'encéphalopathie hypoxo-ischémique [15, 66]. En revanche, la perméabilisation de la BHE exacerbe la neuro-inflammation en autorisant le passage de leucocytes et de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines, chimiokines) produits par d'autres organes depuis le compartiment sanguin.

C. Rôle de l'inflammation dans la physiopathologie du syndrome post-arrêt

Dans cette partie, nous nous attacherons à décrire principalement les événements de la phase aiguë du syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque, dans la mesure où mes travaux de thèse se sont concentrés sur ces derniers. Comme nous le verrons plus tard, nous avons formulé l'hypothèse que les troubles inflammatoires qui se mettent en place à plus long terme, tels que le développement d'une immunoparalysie et d'une fragilité vis-à-vis des infections nosocomiales, pourraient être prévenus par une action très précoce au décours de la réanimation.

1 Initiation d'une réaction inflammatoire généralisée en conditions aseptiques : « the immune priming »

L'arrêt cardiaque s'accompagne d'une activation de l'immunité innée et d'une réponse inflammatoire généralisée. On observe en effet rapidement après la réanimation une augmentation des concentrations en cytokines pro-inflammatoires et des molécules d'adhésion circulantes, ainsi qu'une mobilisation des cellules immunitaires. Cette réaction systémique est étroitement associée au pronostic des patients bien que la relation de causalité n'ait pas encore été établie. Elle pourrait ainsi constituer une cible thérapeutique intéressante.

1.1 **Caractéristiques générales de la réponse inflammatoire aiguë en post-arrêt cardiaque**

Après l'arrêt cardiaque, la réponse inflammatoire systémique, bien que théoriquement d'origine non-infectieuse, partage des similarités avec le sepsis. Certains auteurs parlent même de "sepsis-like" [71]. Sa phase aiguë au cours des premières heures suivant la réanimation, est notamment caractérisée par une production massive et généralisée de diverses cytokines pro-inflammatoires. Dans une étude réalisée sur 61 patients, Adrie *et al.* ont par exemple rapporté une élévation des niveaux sanguins d'interleukine (IL)-6 et -8 dès 3 h après la réanimation [71]. Ils mettent par ailleurs en évidence que les concentrations de certaines de ces cytokines, comme l'IL-6, ou de la forme soluble du récepteur de type II du TNF (TNFR_{II}) sont étroitement corrélées à la sévérité de l'hypoxie tissulaire [71]. L'accumulation de médiateurs pro-inflammatoires dans la circulation s'accompagne aussi d'une stimulation de l'expression des molécules d'adhésion. Une augmentation des concentrations de la forme soluble de l'intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, du vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, des sélectines E et P, peut en effet être détectée durant et à l'issue de la RCP [72, 73, 74]. Ces molécules d'adhésion sont impliquées dans l'activation des leucocytes, et plus particulièrement des neutrophiles, et favorisent les lésions endothéliales.

Une réponse immunitaire cellulaire marquée est également observée au décours de l'arrêt cardiaque. Elle se manifeste par un recrutement massif de neutrophiles dans la circulation périphérique, comme l'indique l'augmentation du ratio neutrophiles/lymphocytes (RNL)

identifié dans de multiples études cliniques [75, 76, 77]. Une étude met d'ailleurs en évidence que les patients avec un RNL élevé (>6) à l'admission, présentent une mortalité plus importante 30 jours après l'arrêt cardiaque [76]. Cette modification du RNL est d'autant plus marquée que la neutrophilie s'accompagne généralement d'une lymphopénie, comme cela est le cas dans de nombreuses situations de stress aigu. Dans une étude rétrospective monocentrique ayant analysé les données de 377 patients admis en soins intensifs après un arrêt cardiaque et ayant survécu pendant au moins 24 h, 40% des patients présentaient une lymphopénie (définie par un comptage inférieur à $1000 \text{ cellules/mm}^3$) à leur admission [78]. La modification rapide des populations de leucocytes circulants semble toutefois être une réponse aspécifique provoquée par la purge surrenalienne et la très forte augmentation des catécholamines circulantes. En effet, il a été montré que la libération endogène ou l'administration de catécholamines entraînait dans un premier temps une mobilisation très rapide de lymphocytes (en moins de 30 min), principalement depuis la rate, puis dans un second temps un appel de granulocytes associé à une lymphopénie [79]. Les granulocytes proviennent principalement de la réserve marginée à la surface des cellules endothéliales de la microcirculation, ainsi que des poumons [79]. Dans un troisième temps, la moelle osseuse est également stimulée et libère des leucocytes. Ces réponses s'expliquent par la présence de récepteurs adrénergiques à la surface des cellules immunitaires qui les rendent sensibles aux variations de concentration en catécholamines, perçues comme des signaux de mobilisation. Cependant, la signalisation médiée par les récepteurs β_2 adrénergiques engage également les lymphocytes dans des processus apoptotiques conduisant *in fine* à une lymphopénie dose dépendante [80]. Or, dans le contexte de l'arrêt cardiaque, la baisse des lymphocytes régulateurs pourrait contribuer à exacerber les processus pro-inflammatoires. L'évolution antagoniste des populations de lymphocytes et de neutrophiles est illustrée par la Figure 8, en reprenant le cas particulier de l'ischémie cérébrale.

Paradoxalement, l'activation initiale des voies pro-inflammatoires s'accompagne également d'une puissante réponse anti-inflammatoire compensatrice au cours de la phase subaiguë du syndrome post-arrêt cardiaque. En plus de la lymphopénie sévère qui peut être observée au décours de la réanimation, le suivi du profil cytokinique des patients après un arrêt cardiaque révèle en effet une élévation des concentrations de marqueurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 [71, 82]. Cette réponse anti-inflammatoire se traduit fonctionnellement par une altération de la réactivité des leucocytes. Des expériences *in vitro* sur sang total prélevé 24 h après la réanimation, ont montré que la production de TNF- α et d'IL-6 des leucocytes en réponse à une stimulation par du lipopolysaccharide (LPS) était altérée chez les patients victimes d'un arrêt cardiaque par rapport à des volontaires sains [71]. Le même phénomène de tolérance endotoxinique est décrit lors de sepsis ou de trauma et semble affecter aussi bien les monocytes, les neutrophiles que les lymphocytes. Si cette immunosuppression endogène est nécessaire pour stopper la propagation des processus pro-inflammatoires destructeurs, elle accroît la vulnérabilité des patients aux infections nosocomiales qui touchent 46 à 76% des patients [83, 84]. La Figure 9 illustre la séquence des événements immunitaires qui surviennent lors d'une ischémie-reperfusion régionale cérébrale. Malgré son caractère systémique, la réponse inflammatoire au décours de l'arrêt

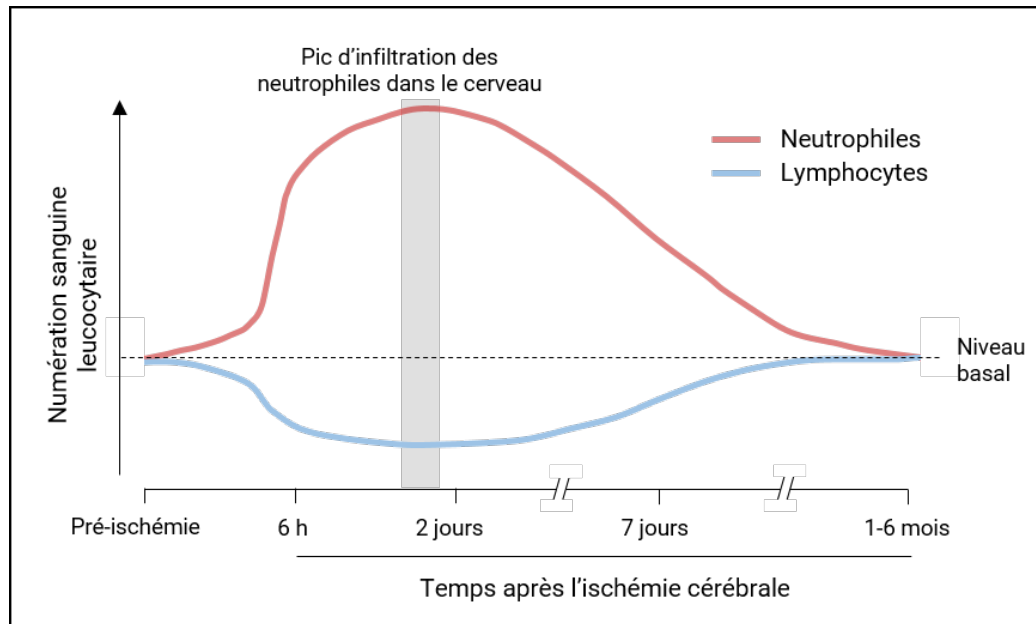


Figure 8: Évolution de la quantité de neutrophiles et de lymphocytes circulants après une ischémie cérébrale (D'après Jickling *et al.* [81])

cardiaque, découle des mêmes stimuli et respecte un cheminement similaire.

Dans une étude menée sur 67 patients, Adrie *et al.* ont constaté que les patients n'ayant pas survécu présentaient des concentrations sanguines en IL-6 plus importantes à l'admission et 24 h après l'arrêt cardiaque que les survivants, comme illustré par la Figure 10 [86]. La médiane de ces concentrations était d'ailleurs similaire à celle observée chez des patients en choc septique. Dans une autre étude multicentrique prospective, Bro-Jeppesen *et al.* ont évalué le caractère prédictif de la mortalité intra-hospitalière de certains marqueurs inflammatoires systémiques chez des victimes d'arrêt cardiaque extra-hospitalier [74]. Ces derniers ont mis en évidence une corrélation entre l'intensité de la réponse inflammatoire, objectivée par une élévation des concentrations sanguines en IL-6 et en procalcitonine, et la mortalité des patients. Les valeurs les plus discriminantes étaient obtenues avec l'IL-6, 24 h après la réanimation. Cependant, ces deux études étant observationnelles, elles ne permettent pas de conclure quant au rôle de l'inflammation dans la physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque. De plus amples investigations sont encore nécessaires afin de déterminer si la réponse inflammatoire est un simple indicateur de la sévérité des lésions d'ischémie-reperfusion, ou bien si elle contribue effectivement à exacerber ces lésions. Un essai clinique intitulé IMICA (IL-6 Inhibition for Modulating Inflammation After Cardiac Arrest) a notamment été débuté en mars 2019 afin d'évaluer l'effet de l'inhibition de l'IL-6 (grâce à un anticorps reconnaissant son récepteur) sur la réponse inflammatoire systémique et le pronostic des patients lors d'un arrêt cardiaque extrahospitalier (NCT03863015).

Si on se base sur les connaissances dans l'ischémie cérébrale régionale, il existe une forte suspicion d'un lien direct entre la réponse inflammatoire systémique et les lésions neuronales retardées. Par exemple, il a été montré que la libération massive de cytokines périphériques

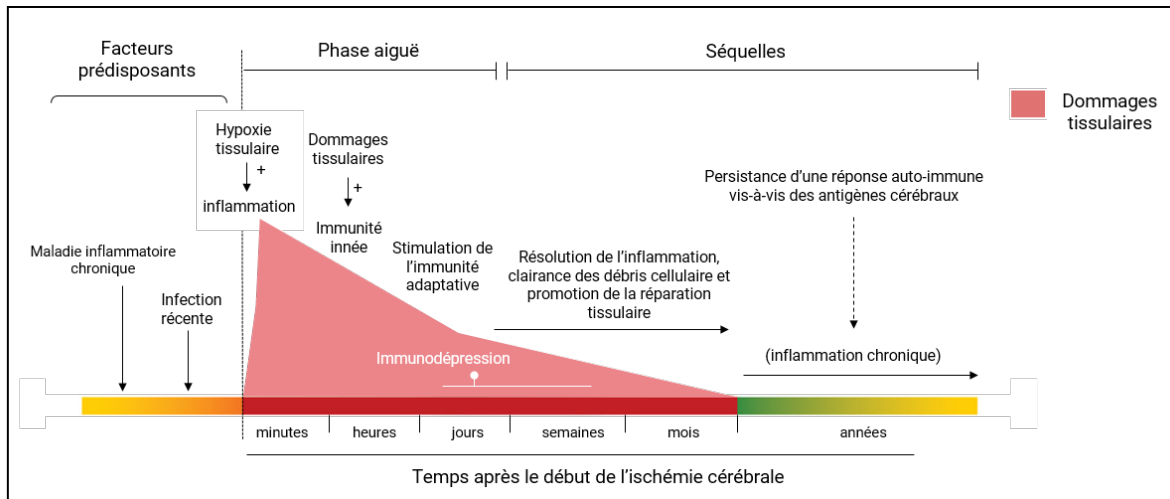


Figure 9: Progression de l'inflammation et de l'activation du système immunitaire au décours d'une ischémie cérébrale (D'après Kamel *et al.* [85])

au cours de la phase précoce suivant l'ischémie cérébrale était associée au développement de troubles neurologiques [87].

1.2 Rôle des Danger Associated Molecular Patterns dans le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque

Après un arrêt cardiaque, la mise en place d'une réponse inflammatoire résulte non seulement des conséquences directes de la reperfusion mais également de l'activation des voies de signalisation de l'immunité innée.

Tout d'abord, l'accumulation d'ERO au moment de la reperfusion stimule directement certaines catégories de cellules immunitaires, locales et circulantes, déclenchant ainsi leur migration vers les tissus et la sécrétion de cytokines et de molécules d'adhésion [88]. En parallèle, une réponse immunitaire similaire à celle observée lors d'intrusion d'agents pathogènes exogènes dans l'organisme se met en place. Elle repose sur une signalisation médiée par les mêmes récepteurs, les pattern-recognition receptors (PRR). Il s'agit en effet de récepteurs membranaires ubiquitaires susceptibles de détecter non seulement des micro-organismes mais également les dommages cellulaires, comme les Toll-like receptors (TLRs) [88]. Ces récepteurs peuvent être activés par des molécules endogènes, appelées alarmines ou Damage Associate Molecular Patterns (DAMPs) et se comportent comme de véritables senseurs de l'intégrité tissulaire. La plupart des DAMPs sont normalement séquestrés dans les différents compartiments cellulaires et ne sont libérés dans le milieu extracellulaire que sous l'effet d'une perte brutale de l'intégrité des cellules (par exemple lors de nécrose secondaire à une ischémie ; Figure 11). Ces molécules sont au coeur du lien entre la mortalité cellulaire immédiate et les dommages qui se produisent à distance de l'ischémie. De même, elles expliquent en partie le phénomène de "remote-injury", *i.e.*, le fait que des lésions locales qui se produisent dans divers organes puissent contribuer au développement de lésions cérébrales [89].

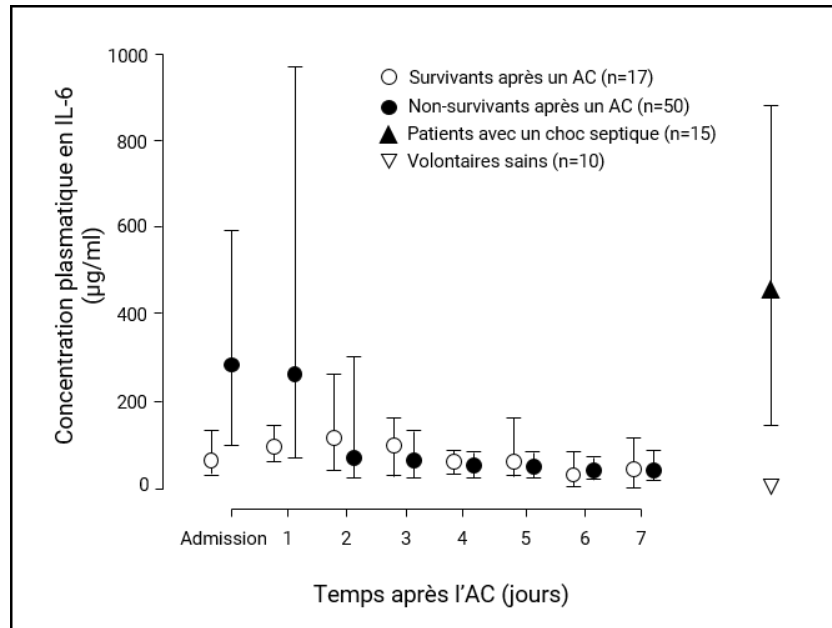


Figure 10: Évolution des concentrations plasmatiques en interleukine (IL)-6 chez des patients réanimés après un arrêt cardiaque d'après l'étude de Adrie *et al.* [86] Les données sont exprimées en moyennes ± espaces interquartiles
AC, arrêt cardiaque

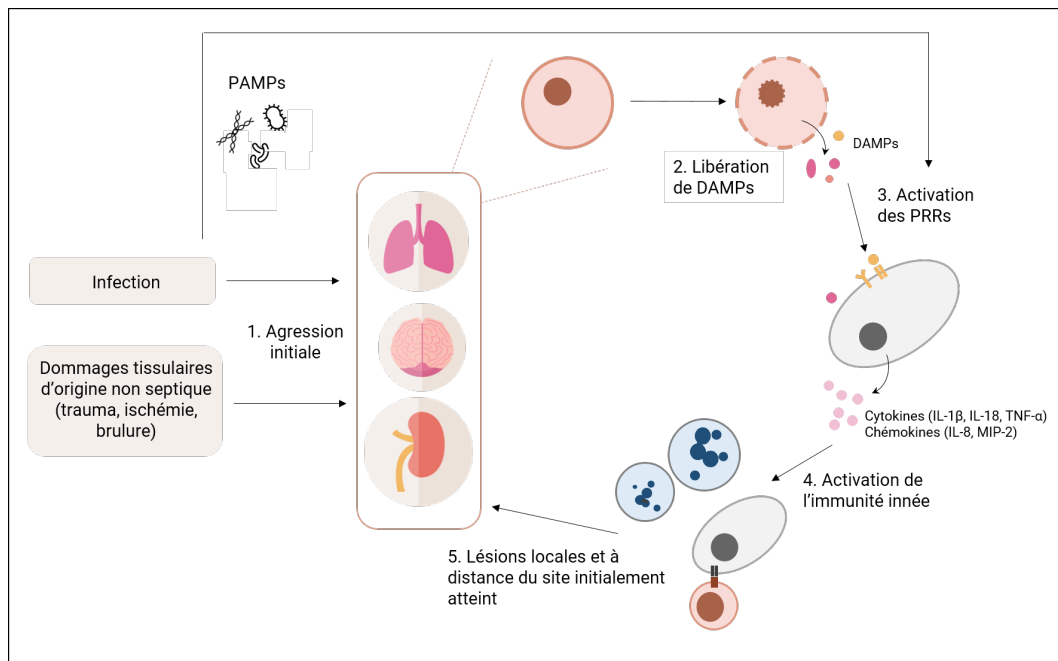


Figure 11: Représentation schématique de la pathogenèse des lésions tissulaires médiées par les Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) et les Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), d'après Ma *et al.* [90]
DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns; PAMPs, Pathogen Associated Molecular Patterns; PRR, Pattern Recognition Receptors

Les PRR stimulés par des DAMP activent les voies de signalisation génériques de l'immunité innée [91], comme celles du nuclear factor- κ B (NF- κ B), des mitogen-activated protein (MAP) kinases et de l'inflammasome. Une cascade d'évènements pro-inflammatoires est ainsi initiée très précocement au décours de l'arrêt cardiaque, à une échelle systémique, favorisant la propagation et l'entretien de la mortalité cellulaire. Par exemple, une fois activé, le NF- κ B est transloqué dans le noyau et induit la transcription de nombreux gènes pro-inflammatoires, codant pour des cytokines, des chimiokines ou encore des protéines du complément. Il entraîne en particulier la production de pro-IL-8 et pro-IL-1 β , dont la maturation dépend ensuite d'une autre voie dépendante des PRR, l'inflammasome NLRP3 [90] (Figure 12).

Parmi les PRR les plus étudiés dans le contexte des lésions d'ischémie-reperfusion, les TLR2 et -4 semblent jouer un rôle central dans le priming de l'immunité innée. Leur expression est en effet exacerbée lors de stress oxydant, de même que leur réactivité suite à la fixation de leurs ligands [92]. De plus, il a été montré que la signalisation des TLR2 et -4 contribuait à la propagation des lésions dans différents modèles d'ischémie-reperfusion régionales [93, 94, 95]. Toutefois, d'autres PRR de la famille des TLR sont également susceptibles d'intervenir dans le « sensing » des dommages tissulaires. Par exemple, le TLR3, spécialisé dans la détection d'ARN viral, détecte également l'ARN libéré par les cellules nécrotiques indépendamment d'une activation virale préalable. L'administration d'anticorps anti-TL3 est d'ailleurs à l'origine d'effets protecteurs dans des modèles *in vivo* d'ischémie-reperfusion intestinale [96].

Selon les critères définis par Oppenheim *et al.* [97] ou Kono et Rock [98], les DAMPs les plus étudiés regroupent les acides nucléiques, comme l'ADN mitochondrial ou nucléaire, la high mobility group box 1 (HMGB1), les heat shock proteins (HSPs), les histones et les protéines S100. En revanche, tous les DAMPs ne semblent pas contribuer de façon équivalente au développement du SIRS en post-arrêt cardiaque. Chez les patients étudiés par Omura *et al.*, les niveaux plasmatiques d'ADN mitochondrial au décours de la réanimation n'étaient par exemple pas corrélés au pronostic final, contrairement à ceux de HMGB1. Des travaux récents indiquent que ce deuxième DAMP jouerait un rôle prédominant dans la perpétuation des dommages tissulaires après un arrêt cardiaque [2].

Enfin, des mécanismes auto-immunitaires semblent participer à l'inflammation lors d'ischémie-reperfusion. Des études suggèrent que des néo-épitopes exprimés par les tissus ischémiés sont la cible d'anticorps naturels qui activent le système du complément [99]. Ce système, qui constitue une autre voie de surveillance de l'intégrité des tissus de l'hôte, détecte ainsi les débris cellulaires et les cellules apoptotiques et répond en conséquence. Les produits du clivage des éléments du complément qui résultent de son activation amplifient la réponse inflammatoire initiale par opsonisation et par la libération d'anaphylatoxines. La Figure 13 synthétise les différents mécanismes initiant et alimentant la réponse inflammatoire au décours du syndrome post-arrêt cardiaque.

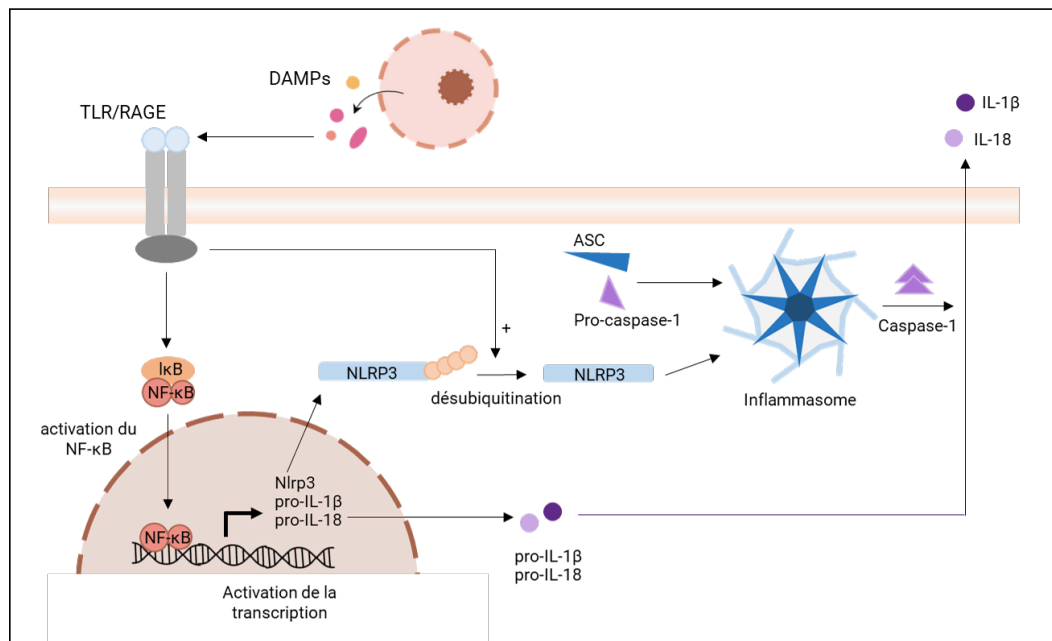


Figure 12: Représentation schématique des voies de l'immunité innée activées suite à la reconnaissance des Damage-Associated Molecular Patterns par leur récepteurs membranaires (D'après Ma *et al.* [90])

DAMPs, Damage Associated Molecular Patterns; *TLR*, Toll-like receptor; *RAGE*, Receptor for Advanced Glycation End Products; *NF-κB*, Nuclear Factor kappa B; *IL*, interleukine; *NLRP3*, NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

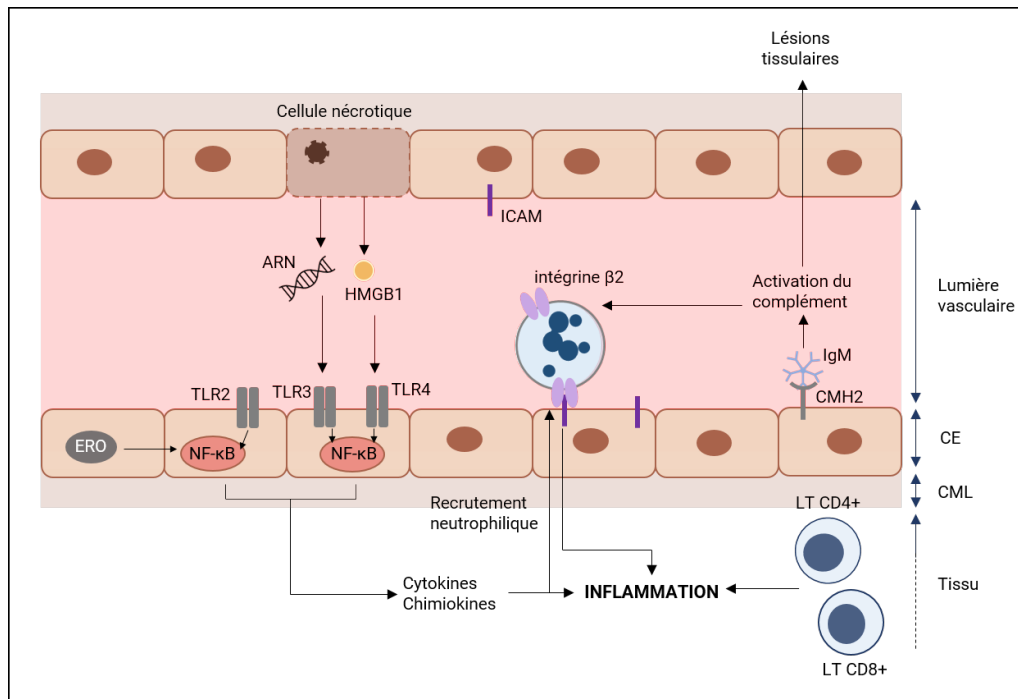


Figure 13: Illustration des principaux processus contribuant au syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque (adapté d'après Eltzhig et Eckle [100])

HMGB1, High Mobility Group Box 1; ICAM, Intercellular adhesion molecule; TLR, Toll-like receptor; LT, lymphocytes T; ERO, espèce réactive de l'oxygène; NF-κB, Nuclear Factor kappa B; Ig, immunoglobuline; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité; CE, cellules endothéliales; CML, cellules musculaires lisses

1.3 Rôle de HMGB1 dans l'arrêt cardiaque

Au cours du travail expérimental qui fait suite à cette synthèse bibliographique, nous avons choisi de travailler spécifiquement sur les conséquences de la libération de HMGB1, dans la mesure où plusieurs études ont confirmé l'importance de cette alarmine dans la signalisation inflammatoire au décours de l'arrêt cardiaque chez l'homme [2, 101]. De plus, elle est mise en évidence dans le milieu extracellulaire très précocement au cours de la reperfusion, ce qui suggère qu'elle intervient très en amont dans cette signalisation. Par exemple, dans un modèle expérimental d'ischémie cérébrale, HMGB1 était libérée par les neurones dans l'heure qui suivait le début de l'ischémie et était détecté dans le liquide cérébro-spinal (LCS) dès 2 h de reperfusion [102]. De même, Liesz *et al.* rapportent un relargage précoce des différentes isoformes de HMGB1 dans la première heure suivant une ischémie cérébrale chez l'homme [87].

HMGB1 est une petite protéine nucléaire qui, en conditions physiologiques, participe au maintien de la structure des nucléosomes et à la régulation de la transcription. Elle est ainsi présente dans la quasi-totalité des cellules eucaryotes [103]. On lui distingue 3 domaines d'intérêt : deux domaines tandem constitués d'environ 80 acides aminés (les HMG boxes A et B), qui sont des domaines de liaison à l'ADN, et une queue terminale de 30 acides aminés qui régule l'organisation spatiale des boxes et la spécificité de leur liaison à l'ADN [103] (Figure 14). L'analyse structure/fonction révèle que c'est la box B qui concentre l'activité cytokine-like de HMGB1. Cette région est notamment reconnue par les macrophages, qui sécrètent en réponse du TNF- α et d'autres cytokines pro-inflammatoires [104]. Dès 1999, Wang *et al.* ont identifié HMGB1 comme un médiateur essentiel des processus inflammatoires dans le contexte du choc septique [105]. Comme toutes les autres alarmines, HMGB1 peut être libérée par les cellules à l'occasion de processus nécrotiques et fonctionne ainsi comme un signal endogène d'agression tissulaire. En revanche, en cas de mort par apoptose elle reste liée à la chromatine et n'active pas ses récepteurs [106]. Elle peut, de surcroît, être sécrétée activement par certains types de cellules immunitaires sous l'influence de stimuli variés, ce qui nécessite préalablement une translocation de la molécule depuis le noyau vers le cytoplasme. Par exemple, il a été montré que des cultures de macrophages ou des monocytes stimulés *in vitro* avec du LPS ou des cytokines pro-inflammatoires endogènes, telles que du TNF- α , de l'IL-1 β , ou encore de l'IFN γ , libéraient HMGB1 de façon dose-dépendante [105, 107]. D'autres études confirment qu'une fois relarguée dans le milieu extracellulaire, HMGB1 est reconnue par les cellules immunitaires environnantes et initie une cascade pro-inflammatoire [103, 108]. Par exemple, l'administration intra-cérébroventriculaire de HMGB1 chez des animaux sains entraîne une augmentation des concentrations tissulaires en TNF et en IL-6, ce qui s'accompagne de l'apparition de troubles comportementaux [109].

Le récepteur advanced glycation end-products (RAGE) constitue une des principales voies de signalisation pro-inflammatoire de HMGB1. Il est exprimé à la surface des phagocytes mononucléés, des cellules musculaires lisses et des neurones [108]. HMGB1 est également susceptible de se lier à certains TLR, notamment les TLR2 et -4. HMGB1 active ainsi les voies de transductions communes aux différents PRR décrites plus haut,

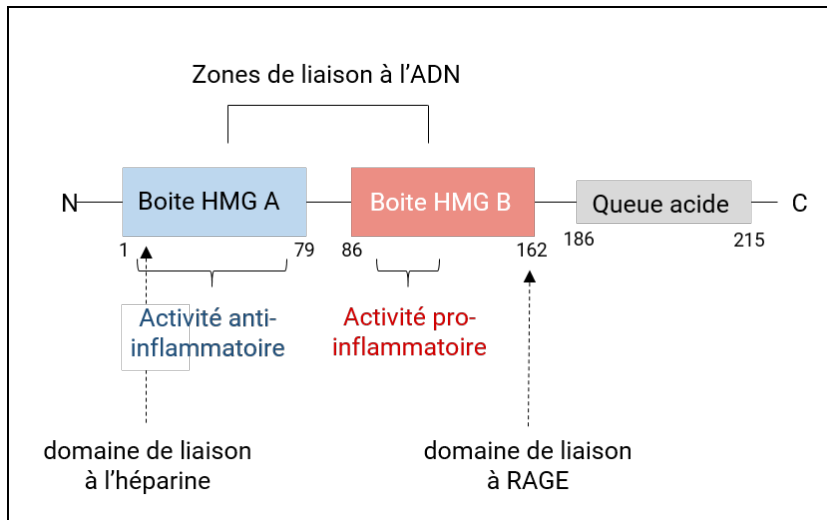


Figure 14: Structure de la High Mobility Group Box 1 (HMGB1), d'après Musumeci *et al.* [103]

et stimule l'expression de multiples cytokines pro-inflammatoires [101] (Figure 15). Dans le parenchyme cérébral, HMGB1 agit par exemple sur les cellules gliales et endothéliales, en stimulant l'expression de $\text{TNF-}\alpha$ et de ICAM-1 [102]. En parallèle, elle déclenche une surexpression de MMP-9 par les neurones et les astrocytes, ce qui participe à l'altération de la BHE [110]. HMGB1 possède également une activité chimiotactique directe, en activant la mobilité des cellules par lesquelles elle a été reconnue. Cette propriété est essentiellement médiée par l'interaction HMGB1-RAGE et l'activation consécutive des voies ERK, $\text{NF-}\kappa\text{B}$ et Src [111]. Il en résulte un remodelage du cytosquelette et un accroissement de la mobilité cellulaire. Néanmoins, des travaux récents ont montré que l'attraction des leucocytes circulant dépendait *a priori* de la formation d'un complexe HMGB1-CXCL12, reconnu par le récepteur CXCR4 [112].

Il existe une controverse sur la capacité de HMGB1 à promouvoir seul la sécrétion de cytokines (TNF , $\text{IL-1}\alpha/\beta$, IL-6 , I-8) et de chimiokines (macrophage inflammatory protein [MIP]- $1\alpha/\beta$) par les leucocytes. Si certains travaux tendent à montrer que l'administration de HMGB1 recombinant purifié est suffisant pour induire une sécrétion pro-inflammatoire dans des cultures de monocytes humains [101], d'autres concluent que cette activité pro-inflammatoire directe est en réalité très faible et nécessite la liaison à des substances bactériennes [113]. Certains auteurs évoquent ainsi la nécessité pour HMGB1 de former des complexes avec d'autres ligands, tels que le LPS ou des acides nucléiques, afin de pouvoir stimuler ses récepteurs. L'activité de HMGB1 dépend par ailleurs de son statut d'oxydoréduction. Plus précisément, la forme totalement réduite de HMGB1, celle qui semble être libérée précocement par les cellules nécrotiques, est dotée d'une activité chémoattractante. Une fois dans la circulation sanguine, HMGB1 subit ensuite une maturation et adopte une forme disulfure dotée d'une activité cytokine-like, comme l'illustre la Figure 16. Cette deuxième forme est en effet détectable uniquement dans le sérum (et non dans le cerveau) après une ischémie cérébrale, et seulement 24 h après le début de l'agression [87].

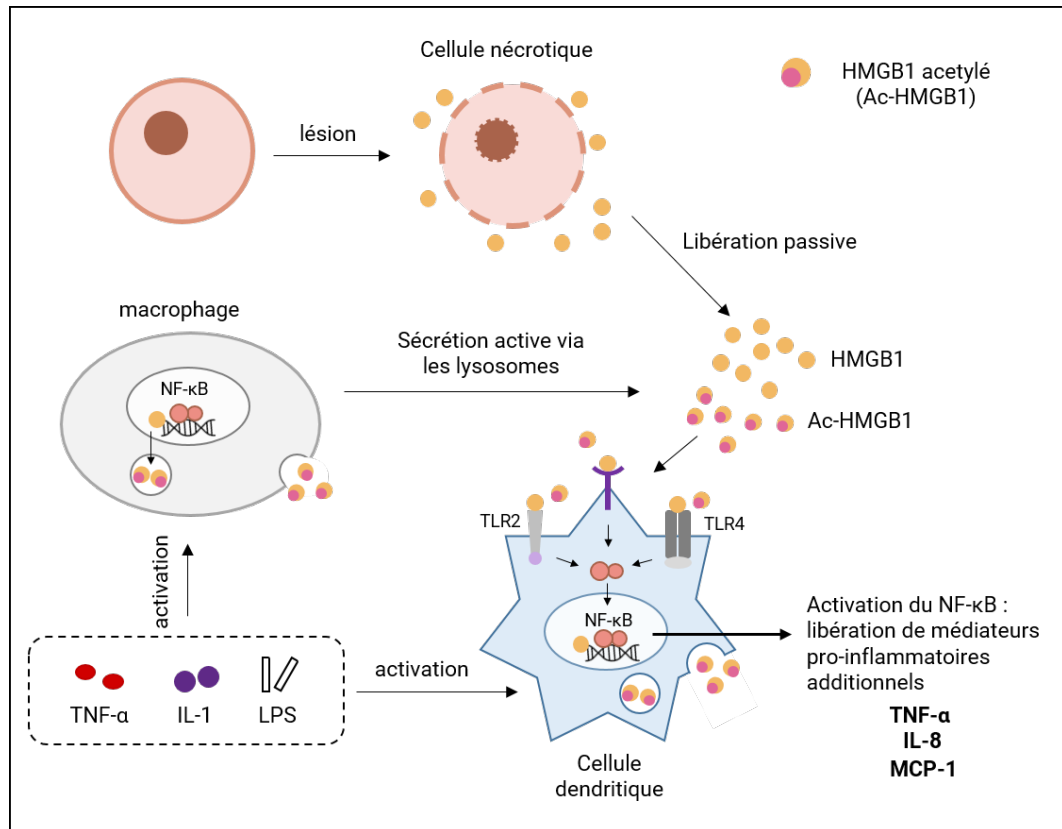


Figure 15: Origine de la libération de la High Mobility Group Box 1 dans le milieu extracellulaire et effets moléculaires, d'après Musumeci *et al.* [103]
TNF, Tumor Necrosis Factor; *HMGB1*, High Mobility Group Box 1; *NF-κB*, Nuclear Factor kappa B; *IL*, interleukine; *MCP*, Monocyte Chemoattractant Protein; *LPS*, lipopolysaccharide

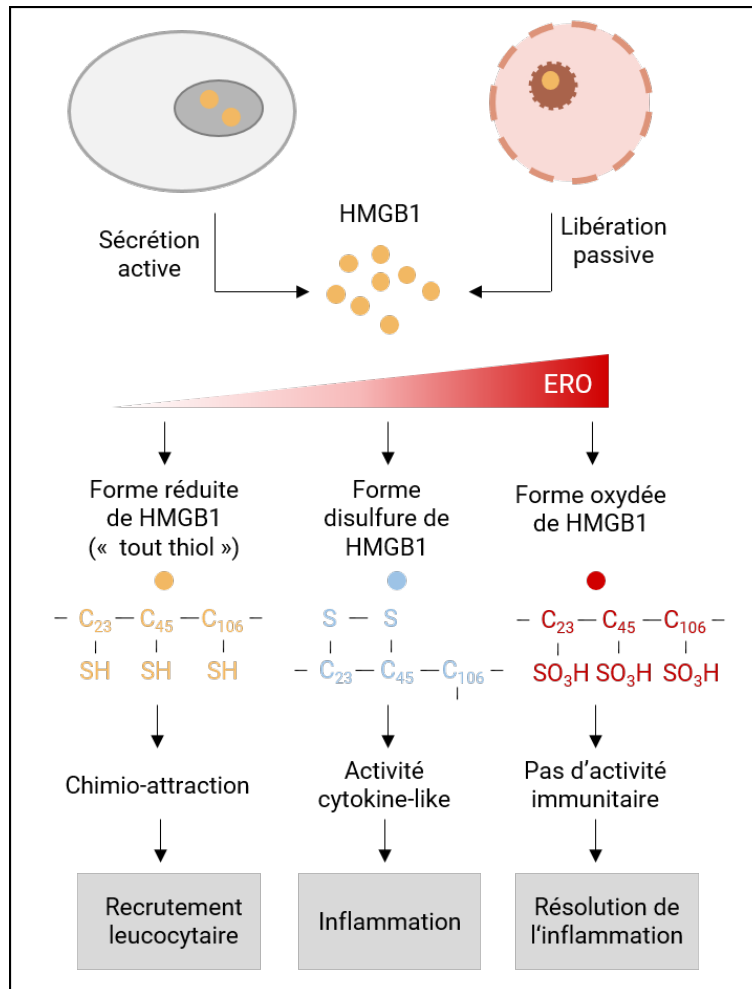


Figure 16: Évolution de l'activité de la High Mobility Group Box 1 en fonction de son état d'oxydo-réduction, d'après Tang *et al.* [114]

HMGB1, High Mobility Group Box 1; ERO, espèce réactive de l'oxygène

Si le rôle de HMGB1 était déjà bien caractérisé dans de nombreuses affections inflammatoires chroniques et désordres auto-immuns, de même que dans le sepsis en tant que médiateur tardif, des travaux menés au cours de la dernière décennie ont également fait émerger ce DAMP dans la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion [103]. Dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le rat, 6 min de fibrillation ventriculaire entraînaient une surexpression de HMGB1 dans l'hippocampe, qui persistait ensuite jusqu'à 7 jours après la réanimation [115]. Cette surexpression était associée à une mortalité neuronale et une élévation des concentrations en IL-1 β et TNF- α dans la même région. Le lien de causalité entre la libération de HMGB1 et l'inflammation locale est d'ailleurs confirmé dans cette même étude grâce à un protocole d'inhibition sélective de HMGB1. L'administration d'un anticorps anti-HMGB1 chez des animaux soumis aux mêmes conditions d'arrêt cardiaque entraînait en effet une diminution des phénomènes délétères décrits ci-dessus.

2 Spécificités de la neuro-inflammation

Le système nerveux central présente des particularités anatomiques et physiologiques qui le protègent en temps normal des dommages causés par une réponse immunopathologique. La BHE constitue un puissant rempart contre l'entrée des protéines plasmatiques et des cellules immunitaires, et le parenchyme cérébrale est dépourvu de cellules dendritiques ainsi que de vaisseaux lymphatiques. Parmi les mécanismes contribuant à cet immunoprivilège, il a également été suggéré que le cerveau était le siège d'une production locale de médiateurs anti-inflammatoires.

Malgré ces mécanismes protecteurs, il est bien démontré qu'une neuro-inflammation délétère se met en place à la suite d'une ischémie-reperfusion cérébrale, même de courte durée [116]. Cette réponse est caractérisée par l'activation des cellules gliales, l'infiltration du parenchyme cérébral par des cellules immunitaires périphériques et le relargage de médiateurs pro-inflammatoires [88]. La neuro-inflammation, alimentée par les médiateurs additionnels libérés par les cellules immunitaires extrinsèques et intrinsèques s'auto-entretient et peut ainsi évoluer durant plusieurs heures à plusieurs jours. Ces désordres inflammatoires infligent collectivement des dommages neuronaux létaux, exacerbent la dysfonction vasomotrice et altèrent l'intégrité de la BHE, favorisant ainsi la formation d'un œdème cérébral qui peut secondairement contribuer au maintien d'une hypoxie tissulaire en dépit de la reperfusion [117]. La compréhension des processus neuro-inflammatoires qui surviennent à l'issue d'un arrêt cardiaque est largement dérivée des connaissances établies dans des modèles d'ischémie cérébrale régionale, malgré les différences qui existent entre ces deux agressions.

2.1 Activation des cellules immunitaires résidentes (microglie, astrocytes)

En dépit de son immunoprivilège, le cerveau fait tout de même l'objet d'une surveillance immunitaire locale. Cette surveillance est assurée d'une part par des macrophages périvasculaires faisant office de sentinelles en regard des vaisseaux de petites à moyennes tailles de la BHE. D'autre part, il existe un réseau de macrophages « facultatifs » dans le parenchyme dont le phénotype résulte d'une spécialisation à l'environnement neural, la microglie [118]. Ces macrophages, se distinguent notamment par la présence de ramifications

émanant de leur corps cellulaire qui les connectent aux autres types cellulaires adjacents (neurones et autres cellules gliales) [119]. La microglie monitore en permanence son proche environnement et joue un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, comme le montre sa capacité à répondre immédiatement aux stimuli de stress ou aux signaux de dommages neuronaux, en sécrétant des cytokines, des facteurs neurotrophiques (tels que l'insulin-like growth factor I [IGFI]) et en phagocytant les débris cellulaires [118].

Suite à une période d'ischémie, même courte, la microglie entame rapidement une transformation phénotypique vers une forme dite "active", qui se poursuit ensuite pendant plusieurs heures après la réoxygénation des tissus [120]. La microglie se comporte dès lors comme un acteur de l'immunité innée, et devient capable d'induire une réponse inflammatoire locale, d'exercer des effets cytotoxiques, et de réguler la réponse lymphocytaire via la présentation d'antigène [118]. Des analyses histologiques ont confirmé que l'arrêt cardiaque s'accompagnait bien d'une activation microgliale significative, comme l'indique par exemple la présence de cellules Iba-1 positives 24 h après la RACS dans le thalamus de rats soumis à 9 min d'asphyxie [121], illustrée par la Figure 17. Dans ce contexte, l'activation de la microglie repose notamment sur la stimulation de divers senseurs de dommages neuronaux comme les récepteurs purinergiques, les TLR, ou encore certains récepteurs du glutamate. Une fois la microglie activée, son panel sécrétoire est profondément modifié. Elle est alors capable de produire de multiples cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), mais aussi d'autres molécules avec un fort potentiel cytotoxique comme les ERO, le NO et les prostanoïdes [120]. La stimulation *in vitro* des récepteurs purinergiques P2X7 de la microglie déclenche par exemple sa prolifération ainsi que la sécrétion d'anions superoxyde, d'IL-1, et de TNF- α [120]. De même, on observe une sécrétion de TNF- α par des cultures gliales primaires, dès 1 h après l'exposition à de l'HMGB1 recombinant [102]. Enfin une autre particularité des cellules microgliales, par rapport à d'autres cellules immunitaires, réside dans leur capacité à se multiplier et à migrer vers les régions endommagées du cerveau. Le caractère bénéfique ou délétère de cette prolifération est toutefois controversé dans le cas de l'ischémie-reperfusion cérébrale [122].

La réponse microgliale aiguë est une réponse non spécifique. Elle intervient comme une défense de première ligne lors de toute perturbation de l'homéostasie cérébrale quelle qu'en soit l'origine. Dans le cas des désordres cérébraux causés par l'arrêt cardiaque et la réanimation, la microglie est soumise à une stimulation initiale particulièrement intense, de telle sorte que sa réponse peut s'emballer et devenir inadaptée. La réoxygénation consécutive à la RACS promeut par exemple une production prolongée d'ERO et de NO par la microglie [120]. Cette production est non seulement cytotoxique mais constitue également des signaux favorisant le recrutement de cellules immunitaires circulantes dans le parenchyme cérébral. Ces cellules peuvent ensuite à leur tour stimuler la microglie, et contribuer à l'exacerbation de la réponse locale et à l'aggravation des lésions neuronales en cours [123] (Figure 18).

Il est également bien documenté que les astrocytes interagissent étroitement avec les neurones environnant et leur prodiguent un support physique et métabolique [124]. En condition de stress hypoxique, il a été mis en évidence que les astrocytes ne libéraient pas uniquement des agents neuroprotecteurs, tels que des facteurs antioxydants ou neu-

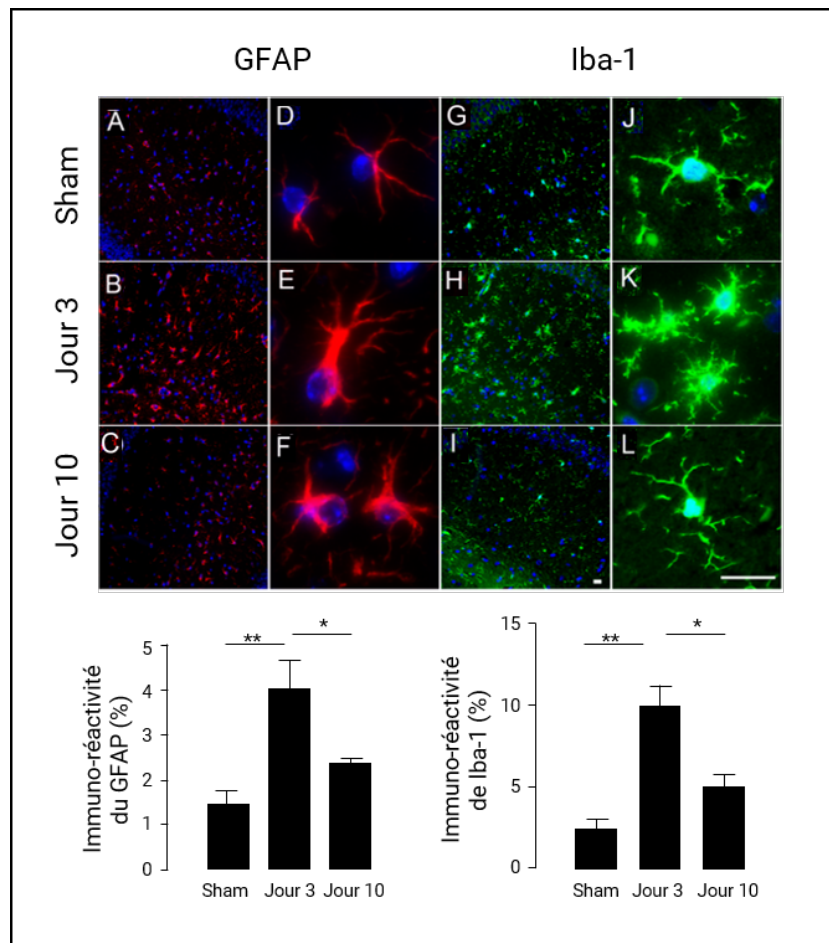


Figure 17: Caractérisation de l'astrocytose et de la réponse immunitaire innée dans le système nerveux central après un arrêt cardiaque, d'après l'étude de Zhang *et al.* [123]

Les auteurs ont analysé par immunofluorescence les cerveaux de rats prélevés à différents temps (3 ou 10 jours) après un épisode de 9 min d'arrêt cardiaque asphyxique suivi d'une RCP ou bien chez des animaux Sham, *i.e.*, n'ayant pas reçu d'arrêt cardiaque. L'ADN nucléaire a été coloré en bleu par du DAPI, le GFAP, un marqueur des astrocytes a été coloré en rouge (A-F) et Iba-1, un marqueur de la microglie activée a été coloré en vert (G-L). Des photographies ont été prises dans l'hippocampe à différents grossissements (10x, A-C et G-I vs 40x D-F et J-L, échelle = 20 μ m). On peut observer une hypertrophie des prolongements des astrocytes après l'arrêt cardiaque (E et F) ainsi que l'adoption d'une morphologie de type amiboïde par les cellules microgliales 3 jours après (K). Les graphiques présentent la quantification de l'immunoréactivité du GFAP et de Iba-1 obtenue par segmentation des images (pourcentage de l'aire de la zone fluorescente par rapport à l'aire totale). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM. **P < 0.01 et *P < 0.05.

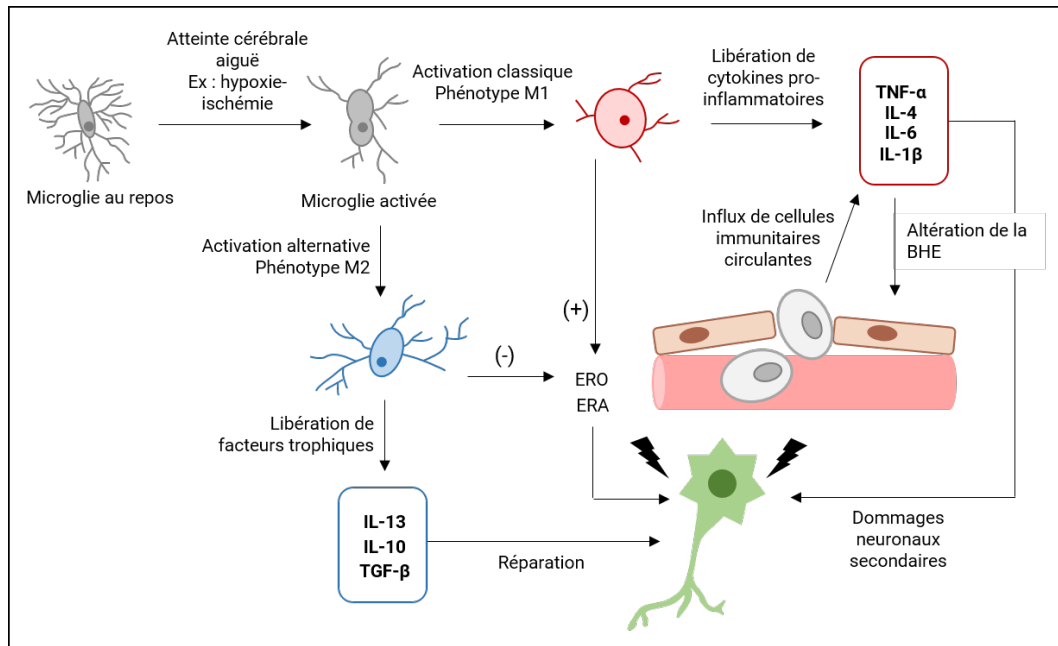


Figure 18: Cascade inflammatoire locale activée par un épisode d'hypoxie-ischémie cérébrale, d'après Bhalala *et al.* [116]

TNF, Tumor Necrosis Factor; *IL*, interleukine; *TGF*, Transforming Growth Factor; *BHE*, barrière hémato-encéphalique; *ERO*, espèce réactive de l'oxygène; *ERA*, espèce réactive de l'azote

rotrophiques mais aussi des myriades de cytokines [102, 125, 126]. Par exemple, dans un protocole expérimental d'ischémie-reperfusion de la moelle épinière, les astrocytes étaient activés précocement après la reperfusion (dès 2 h) mais uniquement dans des zones où les neurones ont par la suite développé des signes de dégénérescence, quelques heures à jours plus tard. Ce résultat souligne l'importance du rôle des astrocytes dans les dommages neurologiques retardés après un épisode ischémique [127]. Néanmoins, les conséquences de l'astrogliose réactionnelle sur la récupération tissulaire et la résolution de la neuro-inflammation semblent ambivalentes, et varient en fonction des modèles et des conditions étudiées. L'étude du profil d'expression génétique de populations d'astrocytes isolées à différents temps dans deux modèles lésionnels différents chez des souris, montre que si les astrocytes activés par une administration intracérébrale de LPS présentent un phénotype délétère, ceux de souris soumises à une occlusion temporaire de l'artère cérébrale moyenne adoptent au contraire un phénotype réparateur [128]. La contribution des astrocytes dans la neuro-inflammation qui se met en place en post-arrêt cardiaque reste donc à préciser.

2.2 Infiltration des leucocytes périphériques

Après l'arrêt cardiaque, la fragilisation de l'unité neurovasculaire par l'inflammation ajoutée à la signalisation chémoattractante rendent possible l'intrusion de cellules immunitaires circulantes dans l'encéphale. L'étude menée par Zhang *et al.* en 2018 [123] sur un modèle de 5 min de *no-flow* chez la souris, met en relation l'ouverture de la BHE, appréciée par IRM immédiatement après la réanimation et 24 h plus tard, et l'accumulation

de leucocytes d'origine systémique dans le cerveau objectivable 72 h après la réanimation. Comme le montre la Figure 19, les auteurs ont mis en évidence une infiltration préférentielle du parenchyme cérébral par des lymphocytes T cytotoxiques (TCD8), sans contribution significative des lymphocytes T auxiliaires (TCD4), ainsi qu'une infiltration massive par des monocytes/macrophages. L'augmentation de ces populations cellulaires dans le cerveau était d'ailleurs associée à une augmentation de ces mêmes populations dans le sang et la moelle osseuse. Ces résultats témoignent de la mise en place d'un véritable cross-talk entre le parenchyme cérébral ischémié et le système immunitaire périphérique à la suite de l'arrêt cardiaque. Néanmoins, la composition des populations infiltrantes présentée par Zhang *et al.* contredit les observations faites par une autre équipe sur un modèle similaire avec 6 min de *no-flow*. Dans l'étude correspondante, l'infiltrat, comprenait de façon majoritaire des lymphocytes TCD4 (80% de l'infiltrat). Les lymphocytes étaient identifiés dans le cerveau des animaux dès 3 h après l'arrêt cardiaque (Figure 20) et jusqu'à 3 après [129]. Ces différences peuvent être en partie imputées à la différence de souches des souris utilisées. D'autres études réalisées dans des modèles d'ischémie cérébrale régionale corroborent la rapidité de l'influx des lymphocytes et des populations monocytaires dans le cerveau [130, 131]. L'infiltration de ces populations semble d'ailleurs précéder celle des neutrophiles dans la zone ischémiée. Dans plusieurs expériences, l'accumulation des neutrophiles n'était en effet observée qu'à partir de 24-48 h après la reperfusion, mais ils devenaient alors largement prédominants dans l'infiltrat [130, 131, 132]. Toutefois, les neutrophiles sont généralement décrits comme le premier type cellulaire mobilisé vers le cerveau lors d'un événement ischémique. Ils sont en effet détectés dans les microvaisseaux cérébraux dès la première heure suivant l'ischémie [132, 133]. Cependant, cette mobilisation intravasculaire ne serait pas automatiquement suivie d'un passage dans le parenchyme et l'accumulation effective des neutrophiles dans le cerveau ischémié est controversée. Enzmann *et al.* [133], ont révélé grâce à un co-marquage laminine- $\alpha 5$ et Ly-6G que, malgré une accumulation précoce, mais relativement modérée, dans les espaces périvasculaires de l'hémisphère ischémié, les neutrophiles ne franchissaient pas la membrane basale des vaisseaux et restaient circonscrits à leur face luminale. Ces observations faites sur des souris ont également été confirmées sur des patients décédés des suites d'un AVC.

La migration des leucocytes dans le parenchyme cérébral est notamment permise par la sur-expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. Les cellules immunitaires peuvent ainsi adhérer aux parois vasculaires, et entamer une migration transendothéliale. Dans le cerveau de patients victimes d'un arrêt cardiaque et décédées entre 3,5 et 9 jours après la réanimation, on a par exemple observé grâce à des immuno-marquages, la présence maximale de sélectine P et d'ICAM-1 sur l'endothélium 2 à 3 jours après l'arrêt cardiaque, alors que le marquage était négatif chez des individus témoins [134].

Si le lien entre neuro-inflammation et pronostic neurologique est assez bien démontré, au moins dans des modèles d'ischémie cérébrale régionale, la contribution fonctionnelle des cellules infiltrantes dans la neuropathogenèse reste en revanche méconnue. Elles sont en effet susceptibles de promouvoir le versant pathologique de l'inflammation, en produisant des molécules pro-inflammatoires additionnelles qui contribuent à altérer le microenvironnement

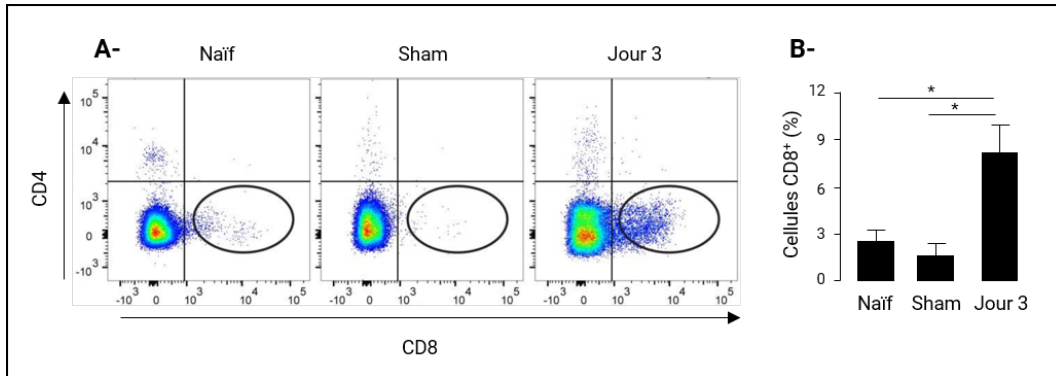


Figure 19: Infiltration des lymphocytes T dans le parenchyme cérébrale après l'arrêt cardiaque et la réanimation cardiopulmonaire quantifiée par cytométrie en flux, d'après l'étude de Zhang *et al.* [123]

Les animaux ont été soumis à 9 min d'arrêt cardiaque asphyxique, puis euthanasiés après 3 jours de suivi (n=15). Des animaux supplémentaires ont également été soumis à la même procédure chirurgicale mais sans arrêt cardiaque (groupe Sham, n=6) et d'autres n'ont reçu ni chirurgie, ni arrêt cardiaque (groupe naïf, n=8). La Figure présente l'aspect caractéristique des acquisitions de cytométrie en flux dans chacun des groupes expérimentaux (A) et la proportion des lymphocytes T CD8⁺ (B). Les données sont exprimées moyenne \pm SEM. *P < 0.05.

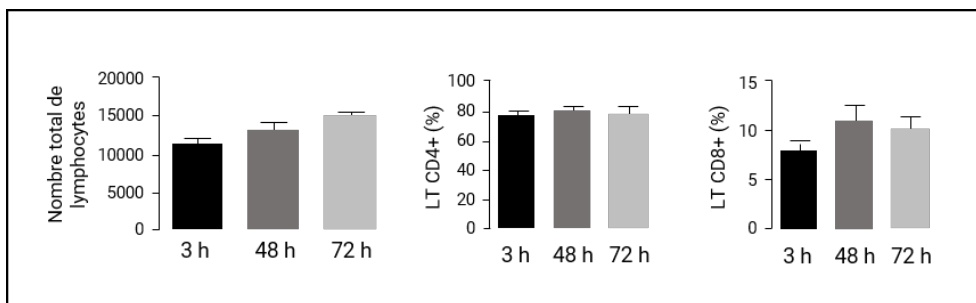


Figure 20: Phénotype des lymphocytes infiltrant le cerveau après un arrêt cardiaque chez la souris, d'après l'étude de Deng *et al.* [129]

Les animaux ont été soumis à 6 min d'arrêt cardiaque par administration de KCl, puis leur cerveaux ont été prélevés à différents temps après la réanimation (3, 48 ou 72 h après, n=6 par temps analysé) afin de déterminer la quantité de lymphocytes dans le tissu par technique de cytométrie en flux. La Figure présente le nombre total de lymphocytes infiltrants, ainsi que la proportion de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ parmi ces derniers. Les lymphocytes étaient en deçà de la limite de détection dans le groupe Sham (données non représentées ici).

et qui peuvent être cytotoxiques. Cependant, des éléments semblent indiquer qu'elles interviendraient également dans des phénomènes de réparation tissulaire. Par exemple, si la suppression de l'infiltration du cerveau par les lymphocytes T est associée à une réduction des tailles d'infarctus cérébral dans l'étude de Hurn *et al.* [135], d'autres résultats montrent que certaines sous-populations de lymphocytes présentent au contraire un effet suppresseur sur la réponse inflammatoire et favorisent sa résolution [136]. Il semble toutefois exister un consensus dans la littérature quant au rôle des lymphocytes T dans la pathogenèse des lésions d'ischémie-reperfusion en post-arrêt cardiaque. Deng *et al.* [129] montrent notamment que les animaux possédant des lymphocytes T déficients (souris TCR α KO) sont protégées des lésions induite par l'arrêt cardiaque et la réanimation par rapport aux animaux témoins, comme l'indique la moindre mortalité neuronale observée dans la région CA1 de l'hippocampe.

Lorsqu'ils sont mobilisés dans le cerveau, les lymphocytes T cytotoxiques alimentent directement la réponse inflammatoire et immunitaire locale par la sécrétion de cytokines, dont l'IFN- γ et le TNF- α . Ils aggravent également la perméabilisation de la BHE en activant les astrocytes et en dégradant les jonctions serrées de l'endothélium vasculaire [123]. En revanche, les lymphocytes T auxiliaires n'exercent pas d'activité cytotoxique directe mais interviennent en activant les autres types cellulaires, dont les lymphocytes T CD8 [137]. Les mécanismes par lesquels ces cellules, dont l'activation repose habituellement sur la reconnaissance d'antigènes exogènes, sont mobilisées vers les tissus ischémiés sont encore mal compris. Des données récentes, obtenues dans des modèles d'ischémie-reperfusion non cérébrale suggèrent que leur activation repose à la fois sur des mécanismes dépendant et indépendant de la présentation d'antigènes [91, 138].

L'accumulation tissulaire de granulocytes est elle aussi associée à une dérégulation de l'inflammation et à des dommages neurologiques [139]. Une fois dans le parenchyme, ils sont en effet susceptibles d'amplifier la réponse inflammatoire par une sécrétion additionnelle d'ERO, de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF- α), et de chimiokines (monocyte chemoattractant protein [MCP]-1, IL-8) [88]. De plus, les neutrophiles présents dans la lumière des vaisseaux ou bien dans l'espace périvasculaire altèrent la BHE en libérant des enzymes protéolytiques et des molécules pro-oxydantes. Plusieurs études ont montré que les taux plasmatiques d'élastase leucocytaire augmentaient fortement après les mesures de réanimation [140, 141]. L'adhésion des neutrophiles à l'endothélium vasculaire inflammé est également suspectée d'être impliqué dans les phénomènes de *no-reflow*. Ainsi, lors d'ischémie-reperfusion cérébrale, les cellules s'accumulent et obstruent rapidement la lumière des artérioles pré-capillaires, des veinules post-capillaires et des capillaires eux même [141], entravant ainsi le rétablissement de l'approvisionnement métabolique. De plus, les "neutrophil extracellular traps" (NETs) favorisent la formation de caillots intravasculaires [142] et peuvent aggraver le phénomène. Pourtant, en dépit de ces nombreux effets délétères, les protocoles expérimentaux de déplétion neutrophilique produisent des résultats contradictoires dans les modèles d'ischémie cérébrale [81, 143]. L'origine des leucocytes systémiques ainsi qu'une partie de leurs effets une fois qu'ils ont infiltré le parenchyme cérébrale sont illustrées par la Figure 21.

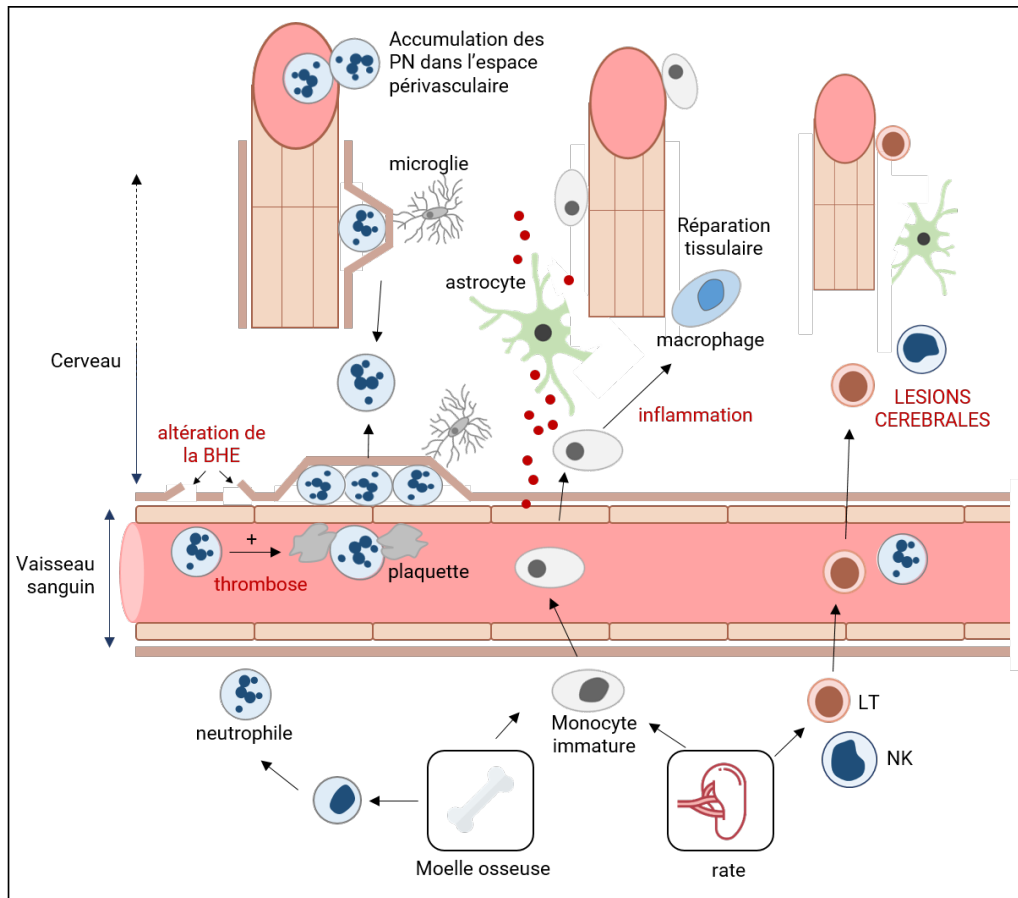


Figure 21: Représentation schématique de l'infiltration des leucocytes dans le parenchyme cérébral, d'après Planas [144].

PN, polynucléaire neutrophile; LT, lymphocyte T ; NK, natural killer

2.3 Libération massive de médiateurs pro-inflammatoires

Au décours du syndrome post-arrêt cardiaque, les lésions cérébrales sont corrélées à une forte synthèse tissulaire de cytokines pro-inflammatoires. Dans le cerveau, comme indiqué précédemment, les cytokines sont produites non seulement par les cellules immunitaires, résidentes ou infiltrantes, mais elles sont également exprimées par les neurones et les astrocytes [101, 145]. Il semble que le TNF- α , conjointement avec l'IL-1 β , joue un rôle crucial dans le déclenchement et l'entretien de la neuro-inflammation en post-arrêt cardiaque. Le TNF- α est non seulement un puissant médiateur pro-inflammatoire mais également un agent pro-apoptotique impliqué dans la régulation des caspases. Il a été montré que cette cytokine pouvait aussi initier une mortalité cellulaire indépendamment des caspases, via la production d'anion superoxyde [146]. Cette propriété découle de sa capacité à induire la XO, qui contribue par ailleurs à la mise en place d'une dysfonction endothéliale [147]. Janata *et al.* suggèrent notamment que l'arrêt cardiaque induit une réponse TNF- α sélective dans le cerveau. Les auteurs ont mesuré chez des rats les concentrations tissulaires en TNF- α et en diverses interleukines (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 et IFN- γ) à différents temps après une fibrillation ventriculaire. Ils ont ainsi observé que seuls les niveaux de TNF- α étaient significativement et durablement augmentés par rapport aux valeurs initiales, à l'exception de l'IL-1 β dont les concentrations étaient également doublées dans certaines des régions du cerveau étudiées [148]. Cette observation contraste avec les mesures faites dans le compartiment plasmatique des patients réanimés, dans lequel l'augmentation de certaines de ces mêmes cytokines, comme l'IL-6, était mise en évidence [71]. Plusieurs travaux pointent désormais les neurones comme la principale source de TNF- α dans le cerveau alors que la production microgliale était jusqu'alors supposée majoritaire [148, 149]. Ces résultats ont été corroborés dans l'arrêt cardiaque non choquable par Teschendorf *et al.* [150]. Ces derniers ont montré que l'expression du TNF- α était quasiment doublée dans le cerveau de rat 6 h après un arrêt cardiaque induit par asphyxie. Toutefois, cette augmentation de l'expression de la cytokine n'était pas associée à une élévation de sa concentration sanguine [150]. Dans un modèle comparable d'arrêt asphyxique, il a également été rapporté une élévation de l'expression d'IL-1 β dans le cortex préfrontal, l'hippocampe et l'hypothalamus 4 h après la RACS [151]. Le caractère délétère de la libération d'IL-1 β est appuyé par des expériences d'administration d'IL-1 β exogène chez des animaux soumis à 30 min d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne et 72 h de reperfusion. Le traitement était en effet associé à un accroissement de la taille d'infarctus [152]. L'élévation des concentrations tissulaires en IL-1 β peut en effet potentialiser l'inflammation en activant la microglie [153] et en stimulant l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales [154]. L'IL-1 β est également susceptible d'induire l'expression d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 ou le TNF- α [153].

Toutefois, lors d'ischémie cérébrale, comme dans toute situation d'inflammation aiguë, une réponse anti-inflammatoire se développe conjointement dans le parenchyme, et semble quant à elle neuroprotectrice, via la sécrétion de transforming growth factor [TGF]- β et d'IL-10 [88, 155, 156]. Ces résultats ont été par exemple corroborés sur des souris modifiées génétiquement afin d'invalider le gène codant pour l'IL-10. Lorsque ces souris

étaient soumises à une ischémie-reperfusion cérébrale, elles présentaient des infarctus 30% plus volumineux que des animaux avec une production intacte d'IL-10 [157]. L'effet de l'IL-10 semble reposer en partie sur la neutralisation partielle de l'activité de l'IL-1 et du TNF- α , via l'inhibition de l'expression de leurs récepteurs ainsi que de leur réactivité [156].

De multiples chimiokines sont aussi libérées au cours d'une ischémie-reperfusion. Dans le cerveau, les chimiokines telles que l'IL-8 et MCP-1, sont initialement exprimées par les neurones et les cellules gliales [158]. Elles transmettent un signal pro-inflammatoire et attirent les cellules immunitaires. La surexpression de MCP-1 (CCL2) et de MIP-1 α (CCL3) mise en évidence quelques heures après la reperfusion chez des patients victimes d'AVC, est d'ailleurs corrélée à un accroissement de l'infiltration des neutrophiles dans le parenchyme cérébral dans les modèles expérimentaux [137, 159, 160]. Le caractère délétère de cette signalisation est confirmé par les résultats de protocole d'injection intra-cérébroventriculaire de CCL3 chez des rats soumis à 1 h d'ischémie cérébrale globale induite par ligature des artères carotides communes, qui présentent une extension du territoire infarcté [161]. Enfin, une dernière catégorie de médiateurs contribuant fortement aux désordres microvasculaires et endothéliaux concerne les MMPs, et plus particulièrement la MMP-9. Le rôle de cette dernière a été largement documenté en post-arrêt cardiaque chez l'homme et sa concentration plasmatique est d'ailleurs associée au pronostic clinique des patients [58, 160]. Suite à une ischémie, les cellules nerveuses se mettent en effet à surexprimer les MMP-2 et -9, tout comme les leucocytes circulants qui en constituent une source majeure. Des MMPs préformées sont en effet stockées dans les granules des neutrophiles, présents en grande quantité dans la lumière des vaisseaux en post-arrêt cardiaque et sont libérées au cours de processus de dégranulation [162]. La MMP-9 activée est capable de désorganiser et dénaturer le collagène mais aussi la laminine et la fibronectine. Dans le cerveau, elle est ainsi à l'origine d'une dégradation de la lame basale entourant les vaisseaux cérébraux et des jonctions serrées, et contribue ainsi activement à perméabiliser la BHE [162]. La Figure 22 synthétise la cascade neuro-inflammatoire qui se produit à la suite d'un épisode ischémique.

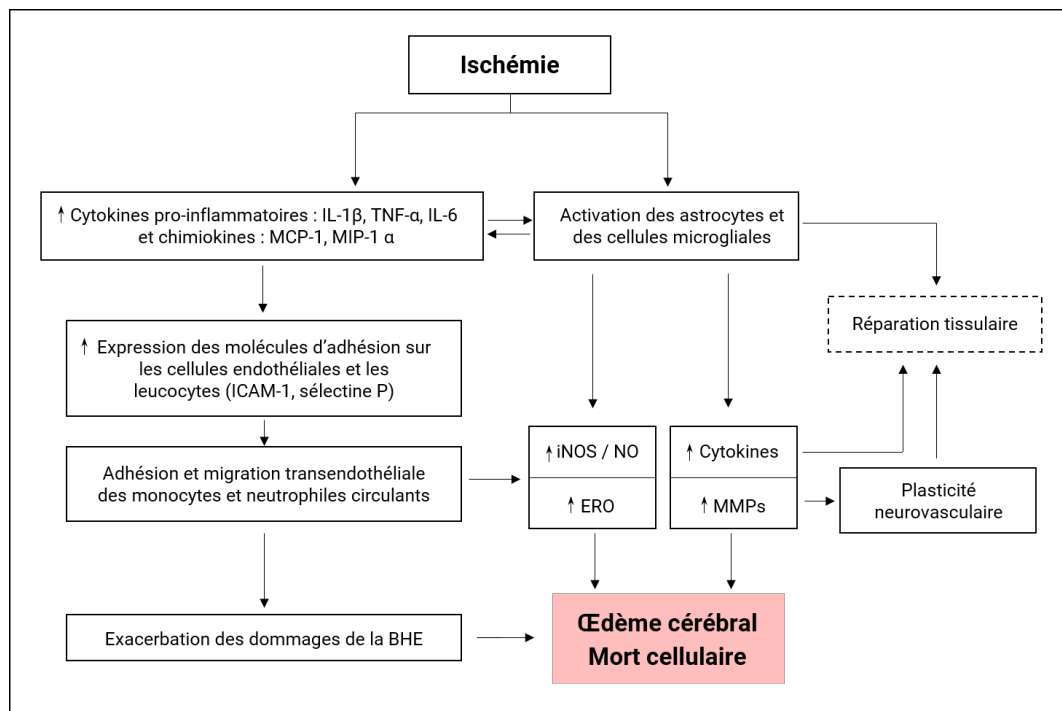


Figure 22: Principales voies impliquée dans la neuro-inflammation consécutive à une ischémie, d'après Amantea *et al.* [163]

IL, interleukine ; *TNF*, tumor necrosis factor; *MCP*, monocyte chemoattractant protein; *MIP*, macrophage inflammatory protein ; *ERO*, espèce réactive de l'oxygène ; *MMP*, metalloprotéinase matricielle ; *iNOS*, monoxyde d'azote synthase inductible

Chapitre 2

Stratégies neuroprotectrices en post-arrêt cardiaque

A. Le contrôle ciblé de la température, une stratégie neuroprotectrice de référence

1 Démonstration expérimentale de l'effet neuroprotecteur de l'hypothermie thérapeutique

1.1 Preuve de concept dans des modèles animaux d'arrêt cardiaque

L'abaissement modéré de la température corporelle entre 28 et 32°C est utilisé depuis le début de années 1950 pour protéger les patients des conséquences délétères d'une ischémie globale. Initialement cette approche permettait était utilisée pour pratiquer certaines chirurgies à cœur-ouvert. Elle a été appliquée aux patients réanimés après un arrêt cardiaque dès la fin des années 1950 [164, 165]. L'usage de l'hypothermie a toutefois été rapidement abandonné dans ce contexte en raison des difficultés techniques pour induire un refroidissement corporel généralisé et de l'incertitude sur les bénéfices associés [166].

Au cours des années 1990 de multiples études expérimentales ont démontré l'intérêt de l'induction d'une hypothermie modérée, entre 32 et 34°C, pour prévenir l'apparition des séquelles neurologiques et améliorer la survie après un arrêt cardiaque, y compris sur des modèles gros animaux. On peut citer par exemple l'étude princeps de Sterz *et al.*, réalisée sur des chiens soumis à 10 min de fibrillation ventriculaire [167]. Dans cette étude, les chiens subissaient une hypothermie modérée à 34°C dès la RCP, maintenue ensuite durant 1 h après la RACS. Les animaux ainsi traités présentaient *in fine* un score de déficit neurologique plus faible ainsi qu'une atténuation des lésions myocardiques par rapport à ceux maintenus en normothermie tout au long de la procédure. Il a également été démontré que les bénéfices étaient conservés si l'induction de l'hypothermie était décalée après la RACS. Ces résultats sont aujourd'hui soutenus par une vaste méta-analyse publiée en 2020 [168] qui a compilé les résultats de 181 études expérimentales ayant documenté l'effet d'un contrôle ciblé de

la température (CCT) dans différents modèles animaux d'arrêt cardiaque ou d'ischémie cérébrale généralisée. Elle confirme que le CCT avec une température cible inférieure à 35°C est bénéfique en conditions expérimentales sur des critères pertinents cliniquement, tels que le comportement, la mortalité ou encore les lésions histologiques. De façon surprenante, l'analyse révèle aussi que l'efficacité du CCT est globalement indépendante de la nature des protocoles expérimentaux. Il n'a ainsi pas été possible pour les auteurs d'identifier un régime optimal de mise en œuvre de l'hypothermie : quelle que soit la durée du maintien de l'hypothermie, la température cible, ou encore le moment d'initiation, le CCT restait associé à des bénéfices neurologiques (Figure 23). Cette méta-analyse confirme notamment que l'hypothermie conserve bien un effet protecteur lorsqu'elle est initiée après la reperfusion. En effet, si le CCT était à l'origine d'une neuroprotection dans la plupart des études sur l'arrêt cardiaque où il était initié après la réanimation, quelques études menées sur des rongeurs dans des modèles d'ischémie cérébrale sélective avaient montré que le décalage de l'induction de l'hypothermie après la reperfusion s'accompagnait d'une perte des bénéfices par rapport à une induction pré- ou per-ischémie. Dans ces études les animaux refroidis après la reperfusion présentaient notamment une récupération neurologique similaire à celle des animaux maintenus en normothermie [169, 170]. Ces discordances peuvent être attribuées en partie aux différences physiopathologiques qui existent entre les deux atteintes mais aussi aux différences entre les durées d'hypothermie appliquées. D'après certains auteurs, l'initiation plus tardive de l'hypothermie doit en effet être compensée par un maintien prolongé pour maintenir son efficacité.

La fenêtre d'efficacité et la température optimale pour l'induction de l'hypothermie, ou plus généralement lors de CCT, après la RACS restent relativement débattues. S'il est communément admis que l'accroissement du délai entre la RACS et l'induction de l'hypothermie s'accompagne d'une baisse de l'efficacité du traitement, la fenêtre exacte reste difficile à préciser. En fonction des études, elle s'étend entre 4 et 12 h après la RACS [168]. Che *et al.* ont par exemple comparé chez des rats l'effet d'un refroidissement à 33°C lorsqu'il était initié à différents moments après la réanimation [171]. Ils ont ainsi constaté une augmentation de la mortalité dans les groupes refroidis à 1 h et 4 h après la RACS par rapport au groupe refroidi immédiatement (64% vs 55% de mortalité, respectivement). Dans le groupe refroidi 8 h après la RACS, la mortalité était similaire à celle des animaux témoins (86% et 83%, respectivement). De même, différentes profondeurs d'hypothermie ont été testées au cours des 30 dernières années, et s'il a été longtemps admis que les températures plus basses, aux alentours de 30-33°C présentaient des effets supérieurs par rapport à un refroidissement entre 34-35°C, la méta-analyse pré-clinique présentée plus haut ne révèlent pas de différence significative entre ces deux conditions.

1.2 Mécanismes d'action présumés de l'hypothermie

L'étude des modèles animaux a permis de générer des connaissances sur les mécanismes de la neuroprotection médiée par l'hypothermie en post-arrêt cardiaque. De nombreuses cibles d'action, aussi bien intra- que post-ischémiques, ont ainsi été identifiées.

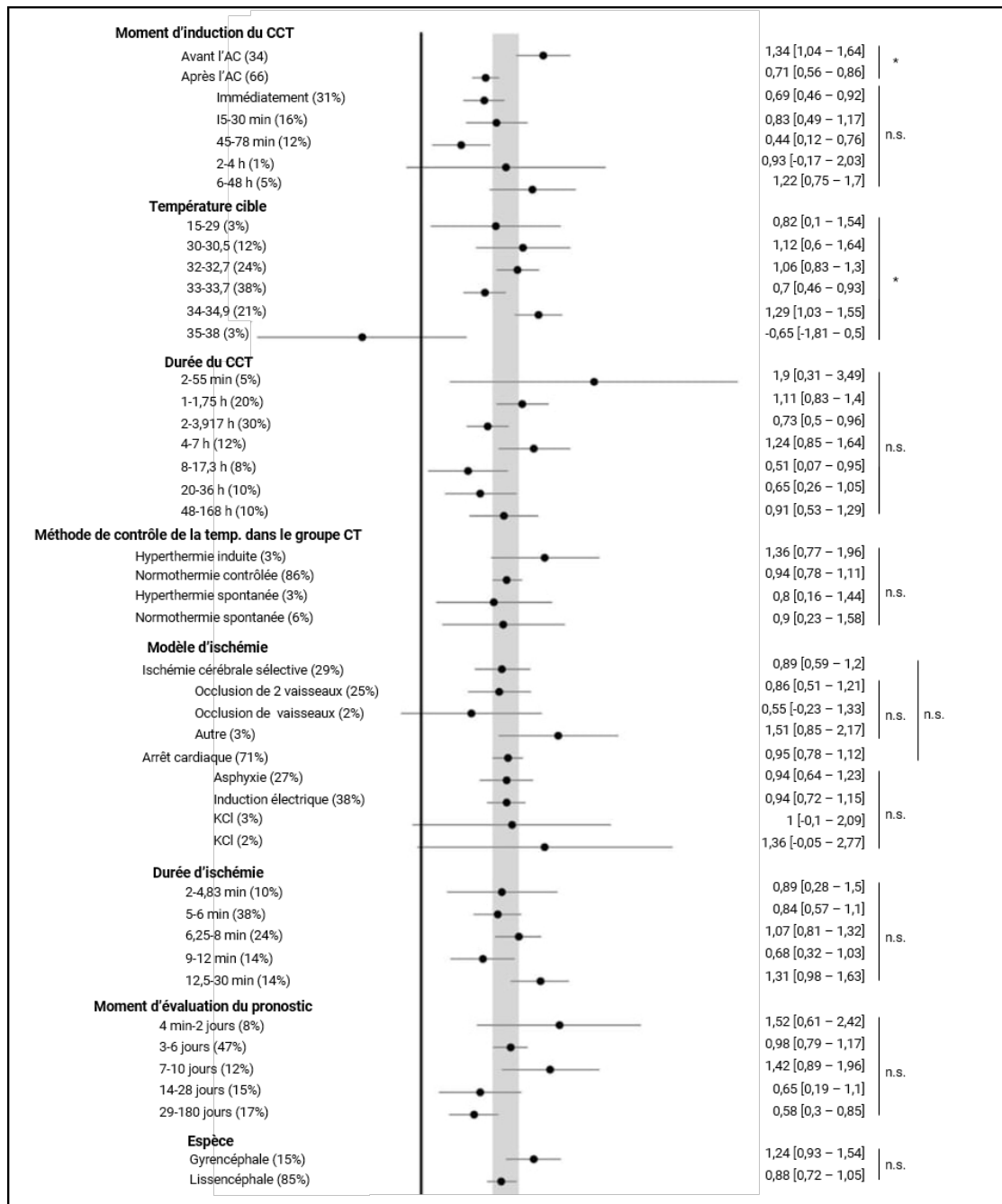


Figure 23: Forest plot du critère de récupération comportementale dans les différents sous-groupes de contrôle ciblé de la température (CCT) (colonne de gauche ; les chiffres entre parenthèses correspondent au poids méta-analytique), d'après la méta-analyse de Olai *et al.* [168]

La ligne verticale pleine représente l'absence d'effet, les cercles l'ampleur de l'effet pour chaque condition (différence moyenne standardisée) et les lignes horizontales les intervalles de confiance à 95% associés (les valeurs numériques correspondantes sont inscrites dans la colonne de droite). La zone grisée correspond à l'intervalle de confiance à 95% de l'effet global. La colonne de droite indique. * $p < 0.0031$; n.s., différence non significative.

L'un des tous premiers mécanismes d'action suspecté de l'hypothermie concerne l'inhibition du métabolisme cérébral. En deçà de 37°C, il a en effet été montré expérimentalement que le métabolisme était abaissé de 6 à 10% pour chaque chute de 1°C de la température cérébrale [172]. Ainsi, au cours de l'ischémie, l'hypothermie protège les cellules des conséquences d'une déplétion trop intense en ATP. Elle est par exemple, associée à une moindre libération de glutamate et de dopamine par les neurones, et donc à une diminution des phénomènes d'excitotoxicité [173]. Cependant, dans la mesure où l'hypothermie conserve une grande partie de ses effets bénéfiques lorsqu'elle est induite à distance de la réanimation après l'arrêt cardiaque, comme présenté plus-haut, il est loin de s'agir de son unique mode d'action. Plusieurs études ont documenté l'effet de l'hypothermie sur le stress oxydant consécutif à la reperfusion, et sur ses conséquences (peroxydation lipidique membranaire, induction de l'apoptose...) [174, 175, 176]. Dans un modèle murin d'ischémie cérébrale globale, il est par exemple rapporté que l'induction d'une hypothermie dans les 10 premières minutes suivant la reperfusion permet de stopper la formation d'ERO [176]. Dans l'étude correspondante, la mesure de la génération d'ERO dans le cerveau a été objectivée par administration de salicylate de sodium, à l'aide d'un dispositif de microdialyse cérébrale. Les expérimentateurs ont ensuite mesuré les concentrations des produits de l'hydroxylation du salicylate, les acides 2,3- and 2,5-dihydroxybenzoïque, dans le dialysat collecté. Chez les animaux placés à 33°C, les auteurs ont ainsi observé une absence de production de radical hydroxyle dans le striatum contrairement aux animaux normothermes. L'hypothermie est aussi à l'origine d'une inhibition des différentes voies de signalisation de l'apoptose et prévient ainsi la mortalité cellulaire tardive. Il a notamment été montré *in vivo* que l'hypothermie stimulait l'expression de la protéine Bcl-2, un puissant inhibiteur de l'apoptose et inhibait au contraire l'expression de facteurs pro-apoptotiques tels que BAX, rétablissant l'équilibre intracellulaire entre ces deux régulateurs à l'issue d'une ischémie-reperfusion [177, 178]. De même, la translocation de facteurs initiateurs de l'apoptose depuis les mitochondries vers le cytosol, comme le cytochrome C, et l'activité des caspases, sont inhibées en conditions hypothermiques [179]. Enfin, il a été montré que l'hypothermie protégeait la BHE au décours de l'arrêt cardiaque [10]. Les mécanismes supposés de cette protection reposent sur l'inhibition de l'activité protéolytique de certaines enzymes, telles que les MMPs [180], ainsi que sur la préservation de l'intégrité des cellules endothéliales et des péricytes [181, 182].

L'action de l'hypothermie en post-arrêt cardiaque est donc multimodale, et ses effets sont nombreux et complexes, ce qui constitue probablement un des principaux atouts de cette stratégie. En ce qui concerne l'effet de l'hypothermie sur la réponse inflammatoire systémique et locale initiée après l'arrêt cardiaque, il est encore relativement méconnu et fait l'objet de multiples controverses.

De nombreuses études *in vitro* ont confirmé que l'hypothermie possédait des propriétés immunomodulatrices. Il a notamment été montré que des leucocytes périphériques humains stimulés avec du LPS produisaient moins d'IL-6 et de TNF- α lorsqu'ils étaient incubés à 33°C par rapport à 37°C [183], de même que des cerveaux de souris soumis à une ischémie [184]. Néanmoins, l'étude menée sur les cellules circulantes humaines rapportait davantage un décalage temporel dans la production des cytokines pro-inflammatoires qu'une

modulation de la capacité de production en réponse à un stimulus. Par exemple, le pic de libération d'IL-6 était retardé de 12 h à 33°C par rapport à une incubation à 37°C, mais l'intensité des pics était comparable. Cet effet était associé à un retard dans l'activation du facteur NF- κ B et donc de la transcription de médiateurs pro-inflammatoires en réponse à l'agression. L'hypothermie modifie également d'autres fonctions des cellules immunitaires, notamment leurs capacités de migration. La migration de neutrophiles sur gel d'agarose en réponse à divers facteurs chémoattractants à 29°C est réduite de 20 à 70% par rapport à une incubation à 37°C. Leur métabolisme oxydant, sur lequel repose une partie de leur réponses aux agents pathogènes, est également altéré dans ces conditions [185].

Ces observations ont été confirmées *in vivo* dans des modèles d'ischémie-cérébrale régionale lorsque l'hypothermie était initiée au cours de l'ischémie [186, 187]. Dans ce contexte, l'hypothermie est non seulement associée à une immunomodulation locale (diminution de l'activation microgliale et des concentrations cérébrales en cytokines pro-inflammatoires) mais aussi à une réduction de l'infiltration du parenchyme cérébrale par les cellules circulantes (neutrophiles et monocytes), entre autres grâce à une baisse de l'expression des molécules d'adhésion par les cellules endothéliales. En revanche, dans les modèles d'arrêt cardiaque, l'effet de l'hypothermie sur la réponse inflammatoire est variable et semble en partie conditionné par le délais d'induction après la RACS. Par exemple, chez des rats soumis à 8 min d'asphyxie [188], l'hypothermie était sans effet sur la concentration sérique de divers marqueurs pro-inflammatoires alors que la température cible était atteinte 1 h après la RACS. En revanche, une autre étude menée sur un modèle similaire, révèle qu'un même niveau d'hypothermie (33°C) atteint dans les 10 premières minutes suivant la RACS, était à l'origine d'une baisse des niveaux d'IL-18 et d'IL-1 β . L'effet de l'hypothermie semblait alors médié par une modulation de l'inflammasome [189]. Même si l'évaluation de la réponse inflammatoire n'est pas exhaustive dans ces deux études, il semble exister une fenêtre temporelle assez étroite à l'issue de la réanimation pour exercer un effet sur la réponse cytokinique systémique. Ce constat semble corroboré par les résultats négatifs des essais cliniques ayant comparé la réponse inflammatoire systémique entre des patients traités par hypothermie thérapeutique et des patients non refroidis après la réanimation [12, 190]. Cependant, dans l'étude de Callaway *et al.* [188], malgré une absence d'effet sur les concentrations sanguines des cytokines pro-inflammatoires, l'hypothermie conservait un effet neuroprotecteur. Ce constat remet en question l'importance du rôle des effets anti-inflammatoires dans la neuroprotection médiée par l'hypothermie. Les différents effets présumés de l'hypothermie sur les processus physiopathologiques contribuant aux lésions d'ischémie-reperfusion sont synthétisés dans le tableau 2.

2 Des bénéfices controversés sur la scène clinique

L'utilisation clinique de l'hypothermie en vue de protéger le cerveau au décours d'un arrêt cardiaque s'est largement répandue après la publication en 2002 de deux essais cliniques multicentriques prospectifs, en dépit de leur taille relativement modeste. L'un a été mené en Europe par le groupe Hypothermia After Cardiac Arrest (HACA) [191] et l'autre en Australie par Bernard *et al.* [192], respectivement sur 275 et 77 patients. Ces deux études

Moment après l'I/R	Physiopathologie	Effet l'hypothermie thérapeutique
Phase aiguë (min-h)	<ul style="list-style-type: none"> - Diminution du débit sanguin cérébral et de l'apport en O₂ et glucose - Transition vers un métabolisme anaérobie et acidose lactique - Déplétion énergétique (ATP), dépolarisation cellulaire et influx de calcium intracellulaire - Libération d'acides aminés excitateurs et de glutamate (excitotoxicité) - Libération de signaux de stress et augmentation de l'expression de gènes de réponse « précoce/immédiate » - Dommages membranaires et dysfonction mitochondriale 	<ul style="list-style-type: none"> - Baisse de la demande métabolique et préservation énergétique - Diminution du métabolisme anaérobie et de l'acidose lactique - Diminution de l'influx de calcium intracellulaire - Augmentation de l'expression de la sous-unité 2 du récepteur AMPA au glutamate et limitation de l'excitotoxicité - Inhibition de l'expression de gènes de réponse « précoce/immédiate »
Phase subaiguë (h-jours)	<ul style="list-style-type: none"> - Activation des voies du NF-κB et des MAPK ; expression de molécules d'adhésion - Production d'ERO - Syndrome coronarien aigu - Stimulation de l'apoptose (augmentation des facteurs BAX, PKCδ, FAS/FAL et activation des caspases) - Activation de la microglie (M1) et infiltration des neutrophiles et des monocytes dans le cerveau - Libération de médiateurs pro-inflammatoires (IL-1β, INF-γ, TNF-α, NO...) - Altération de la BHE et dommages endothéliaux en réponse à l'augmentation de l'activité d'enzymes protéolytiques (élastases, MMPs...) - Augmentation de l'expression d'aquaporine-4 et œdème vasogénique 	<ul style="list-style-type: none"> - Inhibition des voies de signalisation correspondantes et de l'expression des molécules d'adhésion - Baisse de la génération d'ERO - Inhibition de l'apoptose (augmentation de facteur BCL-2, PKCε) - Favorise la transition vers le phénotype M2 de la microglie - Diminution de l'infiltration de cellules périphériques dans les tissus - Réduction des médiateurs pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, MCP-1, MIP3α) - Diminution de l'activité des MMPs et préservation des péricytes (protection de la BHE) - Inhibition de l'expression de l'aquaporine-4
Phase chronique (jours-semaines)	<ul style="list-style-type: none"> - Libération de facteurs trophiques (IGF-1, BDNF, GDNF...) - Activation des cellules souches - Neurogenèse, angiogenèse et synaptogenèse 	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation de la libération de facteurs trophiques et de l'expression de gènes dans la régénération tissulaire

Table 2: Synthèse de la physiopathologie des lésions d'ischémie-reperfusion et effets présumés de l'hypothermie thérapeutique, d'après Tahsili-Fahadan. *et al.* [37]

I/R, ischémie-reperfusion; NF, nuclear factor; MAPK, mitogen-activated protein kinases; PKC, protéine kinase C; ERO, espèce réactive de l'oxygène; IL, interleukine; BHE, barrière hémato-encéphalique; TNF, tumor necrosis factor; INF, interféron; MMP, métalloprotéinase matricielle; IGF, insulin-like growth factor; BDNF, facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales; GDNF, facteur neurotrophique dérivé du cerveau; FAS, first apoptosis signal; FASL, FAS ligand; MIP, macrophage inflammatory protein; MCP, monocyte chemoattractant protein

se sont focalisées sur une même catégorie de patients, *i.e.*, les victimes d'arrêt cardiaque extrahospitalier de cause cardiaque présumée inconscientes à l'issue de la réanimation. Elles ont abouti à des conclusions similaires sur l'intérêt de l'hypothermie dans ce contexte, malgré quelques différences dans la conception des essais. Dans l'essai HACA, le délai médian entre la RACS et l'obtention d'une température cible fixée à 32-34°C était de 8 h alors que l'étude de Bernard *et al.* visait un refroidissement beaucoup plus rapide avec une cible thermique précise de 33°C dans les 2 premières heures suivant la RACS. Dans la première étude, l'hypothermie était ensuite maintenue pendant 24 h contre seulement 12 h dans celle de Bernard *et al.* Dans l'essai HACA, le groupe des patients traités par hypothermie présentait un meilleur pronostic neurologique à 6 mois post-arrêt par rapport au groupe maintenu en normothermie (55% des patients avaient une CPC comprise entre 1-2 dans le groupe hypothermie vs 39% dans le groupe normothermie), ainsi qu'une moindre mortalité, même si le bénéfice était moins marqué (respectivement 41% vs 55%). De même, l'essai clinique Australien a montré que le pronostic neurologique des patients traités par hypothermie était amélioré : 49% des patients du groupe hypothermie ont pu quitter l'hôpital vivant, contre 26% dans le groupe normothermie. Néanmoins, il n'y avait pas de différence de mortalité entre les deux groupes.

Par la suite, une méta-analyse ayant intégré les données d'un 3^{ème} essai clinique monocentrique, destiné à tester un casque réfrigérant dans l'arrêt asystolique, à celles des deux essais précédents, a confirmé leurs conclusions, à savoir que l'hypothermie améliorait la récupération neurologique ainsi que la survie à court terme [193]. En réponse à ces résultats favorables, l'International Liaison Committee on Resuscitation (ILCOR) a publié en 2010 des recommandations préconisant l'induction d'une hypothermie modérée, entre 32 et 34°C, pendant 12 à 24 h chez les patients réanimés après un arrêt cardiaque extrahospitalier choquable [194, 195]. L'hypothermie thérapeutique est ainsi devenu le traitement de référence pour la prise en charge du syndrome post-arrêt cardiaque, malgré des protocoles de mise en œuvre très variables selon les centres de réanimation en terme de méthode de refroidissement, de sédation, de prévention du frissonnement, de vitesse de refroidissement et de critères d'éligibilité [196].

Néanmoins, des critiques ont été rapidement formulées vis-à-vis de l'essai HACA concernant le contrôle de la température des patients du groupe normotherme, dont la température moyenne était en effet bien au-dessus de la normale. Ces critiques ont notamment justifié la conduite de l'essai clinique « Targeted Temperature Management » qui a comparé les bénéfices d'une hypothermie modérée par rapport à une simple prévention de l'hyperthermie après un arrêt cardiaque choquable [5]. De même, une méta-analyse qui a regroupé les résultats de 5 essais cliniques en utilisant le critère GRADE, a remis en question le niveau de preuve des précédentes études. Elle a souligné le risque important de biais associés à ces études, suggérant ainsi que l'hypothermie avait été adoptée de façon prématurée comme traitement neuroprotecteur en post-arrêt cardiaque [197].

Les résultats de l'essai TTM ont confirmé que la température cible en vue d'obtenir une protection optimale devait être réévaluée [5]. Cet essai clinique, plus rigoureux d'un point de vue méthodologique et plus important en taille que les précédents (950 patients), a

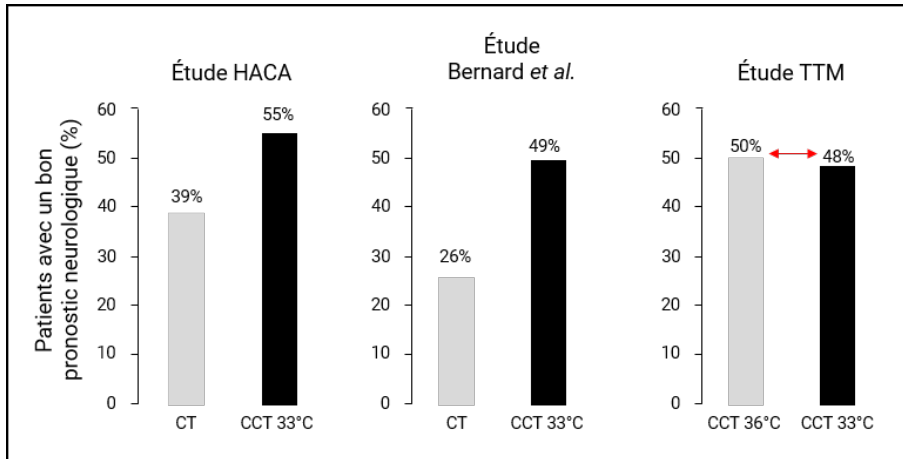


Figure 24: Évolution du pronostic neurologique en fonction du traitement thermique appliqué après un arrêt cardiaque dans les principales investigations cliniques. Le groupe CT correspond à un suivi normotherme des patients après la réanimation et CCT désigne un contrôle ciblé de la température.

comparé l'effet d'un contrôle thermique à 33 vs 36°C chez des patients victimes d'un arrêt cardiaque choquable extrahospitalier. Contrairement aux autres essais cliniques, des critères précis ont ici été utilisés afin de décider de l'interruption des soins de réanimation et la pronostication a été réalisée en double aveugle. L'étude a ainsi conclu à une absence de différence significative concernant la mortalité 6 mois après l'arrêt (50% dans le groupe 36°C vs 48% dans le groupe 33°C ; Figure 24).

Devant ces controverses les recommandations officielles ont évolué. Il est désormais préconisé d'effectuer un contrôle thermique au sens large, entre 33 et 36°C, à l'aide de dispositifs modernes intégrant des algorithmes d'autocontrôle afin d'éviter les refroidissements excessifs ainsi que des fluctuations de température trop importantes. Concernant la durée de maintien de l'hypothermie, la durée optimale reste encore à déterminer, mais elle est généralement fixée à 24h.

Une des hypothèses avancées pour expliquer l'absence de supériorité de 33°C vs 36°C (sub-normothermie) dans l'étude TTM et l'apparente contradiction avec les résultats obtenus dans les modèles animaux concerne l'existence d'une fenêtre thérapeutique étroite. Les méthodes de refroidissement actuellement utilisées en clinique ne permettent pas de refroidir l'organisme aussi rapidement qu'en conditions expérimentales. Or, comme présenté plus haut, l'hypothermie semble perdre en efficacité chez l'animal à mesure qu'elle est induite tardivement après la RACS. Des méta-analyses réalisées chez des patients traités par contrôle thermique sont en faveur de l'existence d'un phénomène similaire chez l'homme [198, 199]. L'étude de Schock *et al.* conclue notamment au fait que les patients refroidis à 34°C en moins de 3,5 h après la RACS présentent un meilleur pronostic neurologique que ceux refroidis plus lentement [198] (Figure 25).

Les stratégies visant à accélérer le refroidissement de l'organisme pourraient ainsi constituer un atout majeur pour exploiter au mieux le potentiel neuroprotecteur de

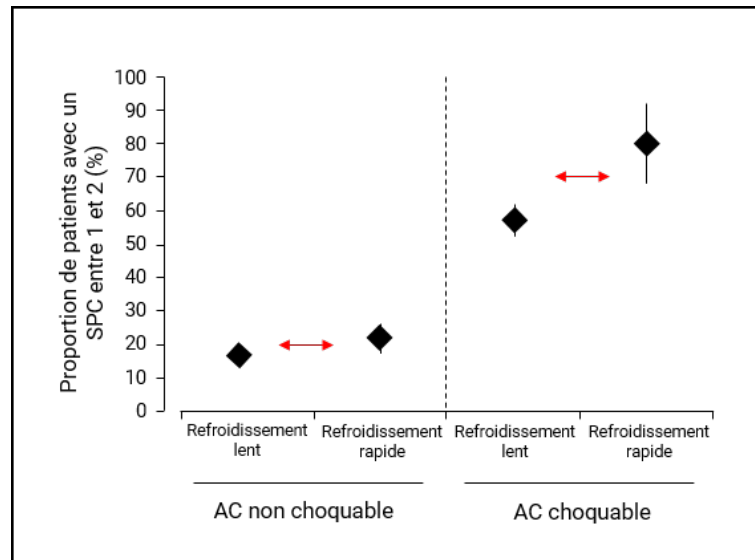


Figure 25: Évolution du pronostic neurologique en fonction de la rapidité du refroidissement dans les arrêts cardiaques choquables et non choquables, d'après l'étude de Schock *et al.* [198]

Ces données sont issues d'une méta-analyse de 13 études, regroupant au total 4700 patients. Ces études ont été catégorisées en « refroidissement rapide » ($n=4$, *i.e.*, température cible atteinte en moins de 3,5 h sans administration intraveineuse de fluides froids) et refroidissement lent ($n=9$). Les losanges indiquent la moyenne et les barres verticales l'écart-type.

SPC, score de performance cérébrale ; *AC*, arrêt cardiaque.

l'hypothermie. Un vaste essai clinique s'est notamment intéressé aux bénéfices de l'induction pré-hospitalière de l'hypothermie [6]. Cette étude a randomisé 1 364 patients réanimés avec succès après un arrêt cardiaque extrahospitalier entre un groupe recevant un refroidissement standard lors de l'admission à l'hôpital et un groupe recevant 2 L de solutés (NaCl 0,9%) à 4°C aussi rapidement que possible après la RACS sur les lieux de l'arrêt cardiaque. Avec cette administration, les patients ont bien fait l'objet d'un refroidissement plus rapide avec une différence moyenne de 1,2°C à l'admission à l'hôpital par rapport aux patients du groupe témoin. Contrairement à ce qui était attendu, la rapidité de refroidissement n'était pas associée à une amélioration de la survie ou du pronostic neurologique, aussi bien en cas d'arrêt choquable que non choquable. En revanche, les patients assignés au groupe refroidis en conditions pré-hospitalières ont présenté davantage d'effets indésirables, notamment un taux plus élevé de « ré-arrêt sur place » et d'œdème pulmonaire au premier contrôle radiographique (41 vs. 30%). Ces résultats négatifs ont davantage été attribués au caractère délétère de l'administration de grandes quantités de fluides en post-arrêt, sans contrôle par des médecins, qu'à la réelle absence de bénéfices d'un refroidissement plus précoce. Cela paraît d'autant plus probable, qu'aujourd'hui, les résultats de l'essai PRINCESS (Prehospital Resuscitation Intranasal Cooling Effectiveness Survival Study) [200] sont prometteurs et semblent confirmer l'intérêt d'une hypothermie précoce après un arrêt cardiaque choquable. Cette étude a évalué l'effet d'un refroidissement initié en intra-arrêt grâce à un dispositif d'évaporation intranasale de liquides froids par rapport à une induction intra-hospitalière par méthode conventionnelle. Dans les deux groupes, la température cible était fixée entre

32 et 34°C et l'hypothermie était ensuite maintenue pendant 24 h. Si l'étude n'a pas permis de mettre en évidence de différence significative sur la récupération neurologique 90 jours après l'arrêt sur la population générale, une analyse post-hoc a identifié un bénéfice plus marqué dans la population des arrêts cardiaques choquables. En effet, dans le sous-groupe correspondant, 32.6% des patients refroidis en intra-arrêt ne présentaient aucune séquelle neurologique (CPC 1) contre 20% dans le groupe Témoin.

De plus, l'essai HYPERION a récemment confirmé la supériorité de l'hypothermie par rapport à un simple contrôle thermique à 36,5-37,5°C dans l'arrêt cardiaque non choquable [201]. L'effet de l'hypothermie a été mis en évidence sur ce groupe de patients alors même que le délai moyen pour atteindre la température cible était de 5 h après la RACS. La population étudiée ici diffère de celle de l'étude TTM qui portait sur l'arrêt cardiaque choquable, et est notamment caractérisée par une atteinte généralement plus sévère. L'hypothermie semble ainsi présenter des bénéfices supérieurs chez les patients atteints plus gravement.

3 La ventilation liquide totale hypothermisante

Face à l'accumulation d'arguments en faveur de l'existence d'une fenêtre thérapeutique étroite après la RACS, il apparait nécessaire de mettre au point des modalités d'induction plus rapide de l'hypothermie afin d'en maximiser les bénéfices. Dans cette optique, le laboratoire dans lequel j'ai conduit mes travaux de thèse a développé une approche basée sur la ventilation liquide totale (VLT) des poumons. La stratégie consiste à remplir les poumons avec des liquides dotés de caractéristiques physico-chimiques qui les rendent compatibles avec la respiration, i.e., avec le maintien des échanges gazeux. Il est ainsi possible d'exploiter la plus grande conductivité thermique de ces liquides par rapport à l'air pour refroidir le sang de la petite circulation et utiliser le poumon comme un échangeur thermique.

3.1 Présentation et défis technologiques de la VLT

La ventilation liquidienne a en partie été rendue possible grâce à la découverte des perfluorocarbones (PFC), molécules appartenant à la famille des hydrocarbures halogénés. Ces liquides présentent en effet une très faible tension de surface et une densité supérieure à celle des fluides biologiques, leur assurant ainsi une bonne distribution dans l'ensemble des territoires pulmonaires. Ils disposent aussi d'une forte capacité de dissolution pour l'oxygène (O_2) et le dioxyde de carbone (CO_2), ce qui en font des media idéaux pour le transport des gaz respiratoires [202]. Cette haute solubilité pour l' O_2 leur a notamment valu d'être étudiés dès 1966 comme des substituts sanguins [203]. À titre de comparaison, le volume d' O_2 qui peut être dissous dans un volume de PFC est 20 fois supérieur à celui qui peut être dissous dans un même volume d'eau [204]. Par ailleurs, il a été montré que l'absorption systémique des PFC était très faible après une administration dans les voies aériennes (faible passage de la barrière alvéolo-capillaire) et que dans ces conditions, ces composés ne présentaient pas de toxicité évidente à long terme [202, 205]. Toutefois, seuls les PFC à chaîne carbonée longue peuvent être utilisés à des fins médicale. En deçà d'une certaine taille (< 8 C), leur température d'ébullition n'est en effet pas compatible avec leur

utilisation sous forme liquide dans des conditions standard de température et de pression. Cependant, même les PFC à chaîne longue restent très volatiles. Ainsi, lors du retour vers une ventilation gazeuse, les éventuels résidus de PFC sont spontanément et rapidement éliminés par évaporation. Par exemple, une étude a évalué l'évolution de la saturation en perfluorodécalin des gaz expirés (grâce à un analyseur thermique) chez des lapins sains ayant reçu un volume unique équivalent à la capacité résiduelle fonctionnelle (CRF), et soumis ensuite à une ventilation gazeuse standard. La vitesse d'élimination du PFC était alors comprise entre 1,25 et 0,75 ml/kg/h au cours des 4 premières heures de la ventilation [206]. C'est ainsi près de 20% du volume initialement administré qui a été éliminé passivement par évaporation durant ce laps de temps. L'ensemble de ces propriétés physico-chimiques font donc des PFC des liquides privilégiés pour la ventilation liquidienne des poumons.

Deux modalités permettent d'assurer la ventilation des poumons à l'aide des PFC : la ventilation liquide totale (VLT) et la ventilation liquide partielle (VLP). La VLT consiste à remplir entièrement les poumons de PFC, en administrant tout d'abord un premier volume de liquide équivalent à la CRF, puis en mobilisant activement et cycliquement un volume courant additionnel qui doit être oxygéné et décarboxylé par instillation et aspiration régulière [207]. Dans cette configuration, l'interface air/liquide est totalement abolie, et le recrutement alvéolaire maximisé, ce qui permet d'accroître la compliance pulmonaire. Ces bénéfices expliquent l'intérêt qui a été porté à cette technique de ventilation en vue d'améliorer la prise en charge des états de détresse respiratoire. Toutefois, la mise en œuvre d'une VLT requiert un ventilateur spécifique pour mobiliser les PFC qui sont des liquides relativement visqueux et denses dans les voies aériennes (l'élasticité thoracique seule étant insuffisante pour les chasser des poumons), tout en contrôlant les paramètres ventilatoires. Jusque là, la seule étude clinique qui a utilisé la VLT visait à améliorer la fonction ventilatoire de nouveau-nés présentant un syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) [208]. Dans cette étude, la VLT était réalisée sans ventilateur dédié, par simple effet de gravité. Le PFC préalablement oxygéné était alternativement administré grâce à une burette positionnée au-dessus des enfants, et récupérés dans un récipient en position déclive après 15 s au contact des poumons. Si les expérimentateurs ont observé une amélioration transitoire de la compliance pulmonaire grâce à la VLT, les complications se sont révélées très fréquentes. Les 3 enfants traités ont en effet rapidement présenté des signes de barotrauma secondairement à la VLT. Ces résultats soulignent la nécessité de dispositifs spécifiques permettant de contrôler les quantités de liquide à instiller à chaque cycle respiratoire ainsi que les pressions de ventilation pour limiter au mieux le risque de volotrauma et de barotrauma. D'autant plus qu'un équilibre constant doit être trouvé entre la minimisation du volume courant et la prévention des collapsus expiratoires, qui surviennent lorsque la dépression utilisée pour aspirer les liquides hors des poumons est trop forte.

À la suite de cet échec et la difficulté initiale de conception d'un ventilateur liquidien, une autre approche s'est développée avec la VLP. La VLP a ainsi concentré la majorité des travaux de recherche, expérimentaux et cliniques, dédiés à la ventilation liquide. Dans cette approche, les poumons sont préalablement remplis avec un volume de liquide proche de la

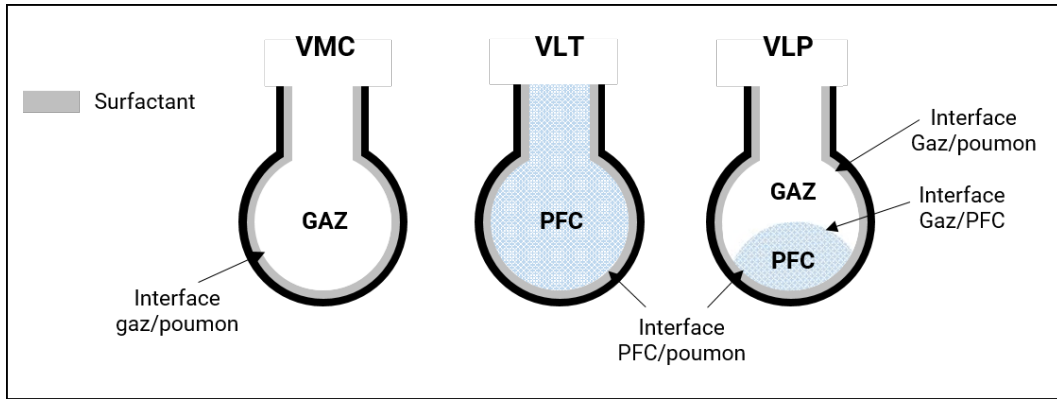


Figure 26: Représentation schématique de l'état de remplissage des alvéoles lors de ventilation gazeuse ou liquidienne, d'après Tarczy-Hornoch *et al.* [211]
VMC, ventilation mécanique conventionnelle ; VLT, ventilation liquide totale ; VLP, ventilation liquide partielle ; PFC, perfluorocarbone.

CRF des poumons (20-30 ml/kg), puis ventilés avec un mélange gazeux conventionnel [207] (Figure 26). Les PFC qui s'évaporent sont progressivement remplacés au cours de la période de ventilation liquide. L'avantage de cette stratégie est de permettre d'améliorer la compliance pulmonaire sans autre dispositif qu'un ventilateur gazeux, et donc de s'affranchir de la barrière technologique imposée par la VLT. Cependant, les essais cliniques chez l'adulte n'ont montré aucun bénéfice lors de SDRA [209, 210]. Au contraire, la PLV était associée à de multiples effets indésirables comme l'apparition d'hypoxémie, de bradycardie ou d'acidose respiratoire, probablement liés à un excès de remplissage pulmonaire [210]. L'impossibilité de contrôler les pressions et les volumes pulmonaires, point clé de toute ventilation protectrice, s'est là aussi révélée préjudiciable.

En parallèle de ces investigations sur la VLP, les progrès technologiques ont relancé l'intérêt pour la VLT. Le développement d'une nouvelle génération de ventilateur liquidien permettant de contrôler précisément les variables ventilatoires au cours de la procédure a permis d'améliorer son innocuité [212, 213]. Au-delà de ses premières applications respiratoires, la VLT est alors également apparue comme une stratégie hautement efficace pour conduire des échanges thermiques et induire une hypothermie rapide. C'est ce potentiel de refroidissement que le laboratoire d'accueil a mis à profit dans ses travaux visant à investiguer les bénéfices d'une hypothermie ultra-rapide sur la fonction neurologique après un arrêt cardiaque.

Les possibilités offertes par la VLT en matière de refroidissement ont été largement démontrées expérimentalement [214, 8, 215]. Forman *et al.* ont par exemple fait la preuve de l'efficacité de l'utilisation des poumons comme échangeur thermique chez des agneaux [215]. En ventilant les animaux avec des PFC à 30 ou 20°C ils ont observés que le refroidissement était proportionnel à la température des liquides, avec une vitesse d'abaissement de la température rectale de respectivement 4,8 et 8,4°C/h (Figure 27). Dans ces différents modèles animaux, il est apparu que la vitesse de refroidissement par VLT était hétérogène entre les différentes régions de l'organisme. Toutefois, même les viscères abdominaux, qui

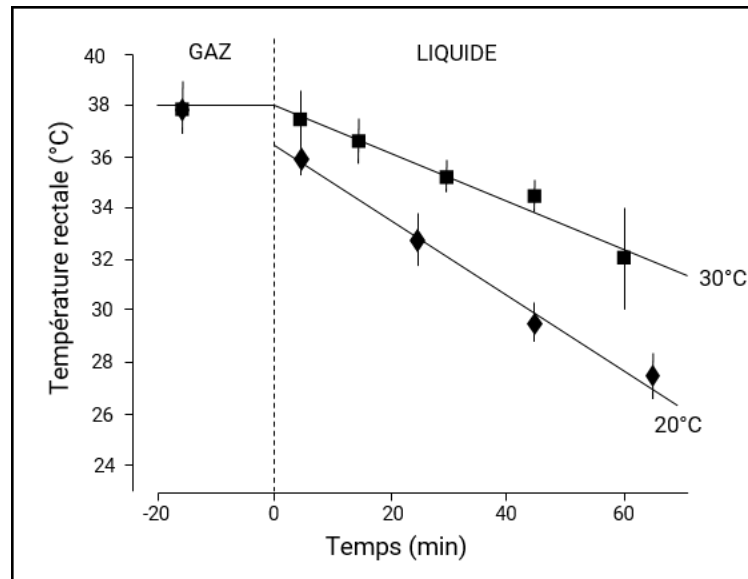


Figure 27: Évolution de la température rectale lors d'un épisode de ventilation liquide avec des perfluorocarbones à 20°C ou 30°C chez l'agneau, d'après Forman *et al.* [215]

présentent la plus grande inertie thermique peuvent être refroidis à 33°C en seulement quelques minutes (Figure 28) [216]. La rapidité du refroidissement corporel obtenu lors d'une VLT avec des PFC est permise par la conductivité thermique élevée de ces liquides, la grande surface d'échange de l'épithélium alvéolaire et le débit sanguin maximal dans les poumons. Ainsi, malgré les limites biologiques qui plafonnent le débit des PFC au cours d'une ventilation, et donc la capacité d'extraction de chaleur de la procédure, la VLT reste une technique d'induction de l'hypothermie très intéressante. De plus, l'atout principal de la VLT réside dans le fait que le refroidissement par voie pulmonaire est indépendant de la masse corporelle, contrairement aux méthodes de refroidissement externes, qui offrent un refroidissement de l'ordre de 1 à 2 C°/h chez l'homme adulte [217, 218]. La surface d'échange au sein de l'arbre bronchique est en effet relativement conservée quelle que soit la taille de l'animal, ce qui permet de maintenir des échanges thermiques équivalents [7]. Des modèles mathématiques montrent ainsi qu'un refroidissement similaire à celui observé dans les modèles de petits animaux pourrait être obtenu chez l'homme [7].

Parmi les autres stratégies de refroidissement exploitant les caractéristiques des PFC, on peut par exemple citer les dispositifs de vaporisation intranasale de PFC froids qui permettent de refroidir le cerveau de façon ciblée [219]. Si cette technique présente l'avantage d'être moins invasive que la VLT, il semble que le refroidissement local ainsi obtenu soit altéré par l'arrivée de sang en provenance de territoires normothermes. Or, la VLT, en plus de son efficacité systémique, permet de refroidir l'encéphale en un temps similaire. Chez le lapin, l'agneau ou le porc, la température tympanique est en effet abaissée à 33°C en seulement 10 à 15 min [7, 10, 220].

En ce qui concerne son mécanisme d'action, il semble que la VLT exerce son effet au cours d'une fenêtre optimale comprise entre 0 et 2 h après l'arrêt, en accord avec les résultats

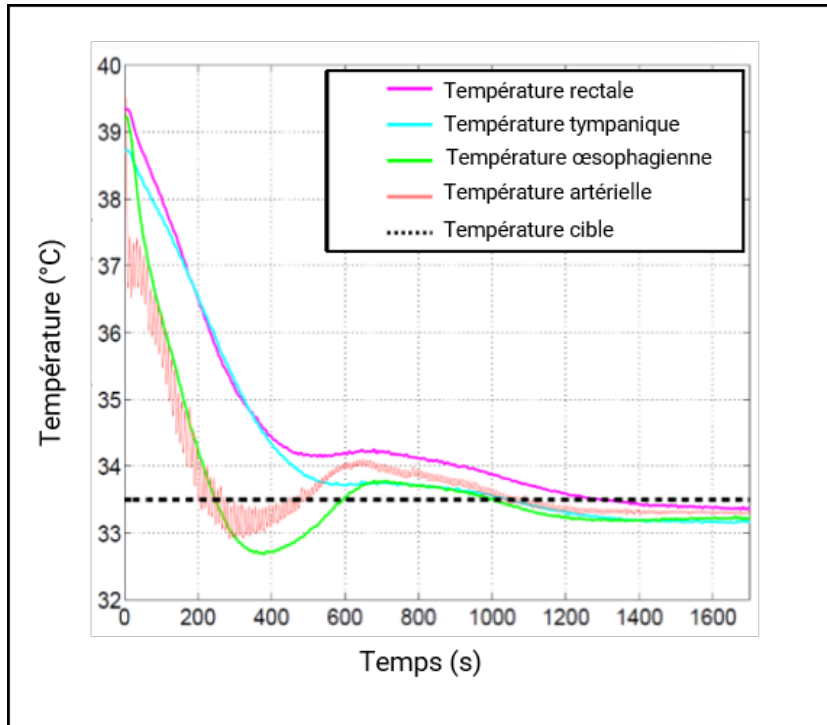


Figure 28: Évolution des différentes températures corporelles lors d'un épisode de ventilation liquide totale hypothermisante chez un agneau, d'après Nadeau *et al.* [216]

des études expérimentales et cliniques présentées plus haut. Durant cette période il a en effet été montré que la VLT hypothermisante limitait la formation d'ERO et la dysfonction mitochondriale secondaires à la reperfusion [221], ainsi que l'ouverture précoce de la BHE [10]. D'autres aspects de la physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque restent cependant encore inexplorés. Par exemple, l'effet anti-inflammatoire d'une hypothermie ultra-précoce et plus particulièrement son effet sur les phénomènes initiateurs de la réponse inflammatoire sont méconnus. Or, il est maintenant bien décrit que l'inflammation joue un rôle majeur dans le développement d'une seconde phase lésionnelle après l'arrêt et contribue à la détérioration du pronostic neurologique. Son inhibition pourrait donc constituer un de éléments clés qui conditionnent l'efficacité de l'intervention.

3.2 Les dispositifs expérimentaux de ventilation liquide totale pour une application en post-arrêt cardiaque

Le laboratoire d'accueil a fait la preuve de concept que la VLT permettait d'induire efficacement une hypothermie modérée tout en maintenant les échanges gazeux, en co-développant avec l'Université de Sherbrooke au Québec, un prototype de ventilateur liquidien innovant répondant à toute une série d'exigences en terme de contrôle des variables ventilatoires. Ce développement technologique a notamment permis de mettre au point un dispositif capable de contrôler finement et de façon continue les profils expiratoires, et de réguler les pressions et volumes de remplissage, afin d'éviter les volotraumas tout en limitant la survenue de collapsus expiratoires [216, 188].

Le prototype Inolivent, conçu à l'Université de Sherbrooke pour ventiler des animaux de petite taille (de 2 à 5 kg), fonctionne sur la base d'une circulation de PFC en circuit semi-fermé (Figure 29). Le déplacement des fluides est assuré par deux pistons indépendants, commandés par des moteurs limités en pression et en volume. Le sens de circulation des PFC est contrôlé par des valves. La circulation débute ainsi dans l'oxygénateur où les fluides sont oxygénés et décarboxylés par bullage d'O₂ à travers une membrane. Les PFC passent ensuite dans un réservoir tampon qui permet d'ajuster leur température. Depuis ce réservoir, les PFC sont aspirés par la pompe inspiratoire puis instillés dans les poumons. Ils sont ensuite ré-aspirés activement par la pompe expiratoire et ré-injectés dans l'oxygénateur en passant à travers un filtre de 0,2 µm destiné à retenir les résidus biologiques. Les pertes de PFC par évaporation sont limitées grâce à un condenseur coiffant la surface ouverte de l'oxygénateur. L'une des innovations de ce ventilateur concerne l'intégration d'un système de régulation des pressions. Il s'agit d'une boucle de régulation dynamique basée sur les mesures de la pression de fin d'expiration et de fin d'inspiration (PEEP et PEIP, respectivement) grâce à un capteur situé sur une pièce en Y en regard de la connexion entre le circuit et la sonde endotrachéale. À partir de ces mesures et des consignes de pression et de volume maximales, un algorithme ajuste en permanence la dynamique expiratoire [216]. Lors de l'induction d'une hypothermie par VLT, il est également important de prévenir la survenue d'un refroidissement excessif, tout en conservant une vitesse de refroidissement maximale. Il a en effet été montré que les états d'hypothermie trop profonde pouvaient s'accompagner d'effets indésirables [222]. Pour cela, Inolivent intègre un bain de régulation de la température du réservoir et donc des PFC contenus. La température des PFC inspirés peut ainsi être modulée au cours de la procédure de manière à atteindre la température cible renseignée par l'opérateur, tout en limitant *l'under-shoot*, *i.e.*, le passage de la température corporelle sous la température consigne [223].

À l'aide de ce prototype, le laboratoire d'accueil a confirmé que la VLT réduisait très rapidement la température corporelle dans tous les compartiments de l'organisme chez le lapin [10, 8, 9] et l'agneau [7]. Cette puissance de refroidissement était également conservée au décours d'un arrêt cardiaque, même si le débit cardiaque était diminué. Avec un autre dispositif, la VLT initiée pendant la RCP chez des porcs adultes en fibrillation ventriculaire permettait en effet de refroidir les animaux à 34°C en 20 min, sans altérer l'efficacité du massage cardiaque [220].

L'induction ultra-rapide d'une hypothermie modérée était par ailleurs associée à de puissants effets protecteurs dans des modèles mimant une situation d'arrêt cardiaque de l'adulte [10, 8, 9]. Comme l'illustre la Figure 29, des lapins soumis à 10 min de fibrillation ventriculaire et traités par VLT hypothermisante présentaient une amélioration spectaculaire du taux de survie et de la récupération neurologique par rapport, non seulement à des animaux ayant reçu un suivi normotherme, mais également par rapport à des animaux refroidis plus lentement (température de 32°C atteinte en 90 min grâce à des couvertures froides et l'administration de fluides froids par voie intraveineuse) [10]. Dans cette étude la médiane des scores de dysfonction neurologique 2 jours après l'arrêt cardiaque était de 40% dans le groupe traité par VLT contre 70% dans le groupe ayant reçu une hypothermie

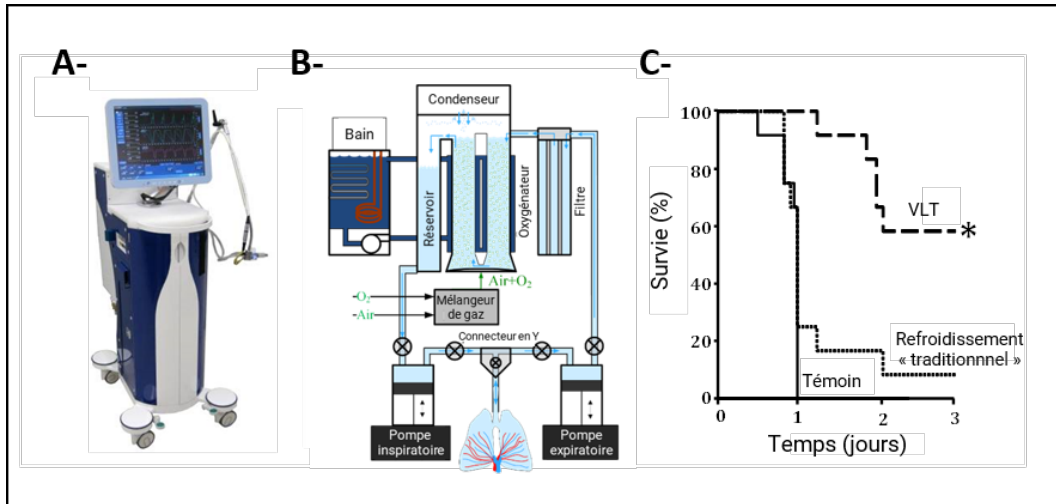


Figure 29: Photographie (A) et schéma fonctionnel du dispositif de ventilation liquide totale (B). Illustration de la survie de lapins soumis à un arrêt cardiaque expérimental suivi d'un refroidissement traditionnel, d'un refroidissement ultra-rapide par VLT ou bien d'un suivi normotherme (témoin) (C). Dans le premier cas, la température cible de 32°C a été atteinte en 60-90 min, alors que seulement 10-15 min était nécessaire avec la VLT. L'hypothermie a été maintenue durant 3 h avant réchauffement et sevrage de la ventilation mécanique. *, $p < 0.05$. Adapté d'après Kohlhauer *et al.* [10]

conventionnelle. De plus, il a été vérifié que cela était bien l'hypothermie et non d'autres propriétés de la VLT qui était à l'origine de la protection, en comparant les effets d'une VLT hypotherme à ceux d'une VLT normotherme. Les bénéfices étaient en effet complètement perdus lorsque les animaux recevaient une ventilation normotherme en post-arrêt cardiaque.

Le dispositif Inolivent, initialement développé pour un transfert chez le nouveau-né, a depuis été redimensionné de manière à pouvoir transposer les mêmes principes de ventilation chez l'adulte (Figure 30). Le volume des pompes a notamment été adapté au volume pulmonaire de l'adulte, et l'ajustement des paramètres ventilatoires au cours de la procédure a été entièrement automatisé (seules les valeurs consignées doivent désormais être renseignées par l'opérateur). L'évaluation de ces dispositifs et leur mise aux normes pour une production industrielle et une exploration clinique sont en cours. Nous reviendrons sur ces éléments importants dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

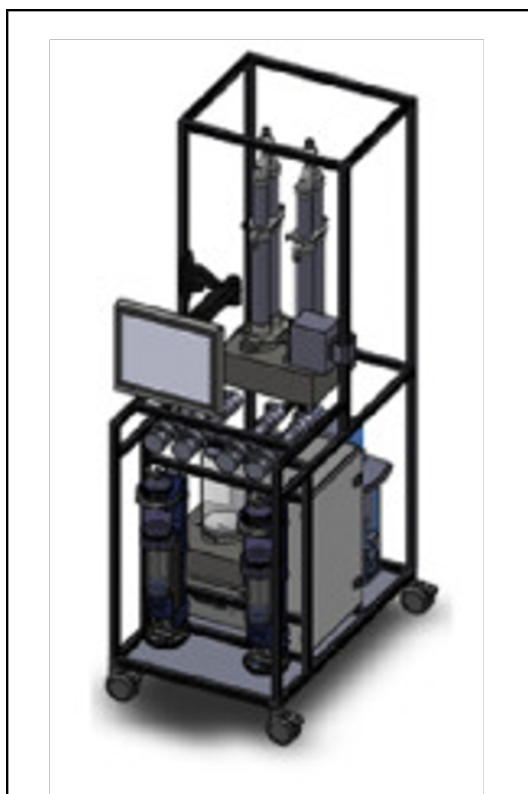


Figure 30: Modélisation 3D du dispositif de ventilation liquide totale dédié à l'adulte.

B. Effet neuroprotecteur de stratégies immunomodulatrices

Étant donné le rôle central joué par les processus inflammatoires dans la pathogenèse des lésions cérébrales en post-arrêt cardiaque, les stratégies immunomodulatrices apparaissent prometteuses en vue de limiter la mort neuronale. D'autant plus que la réponse inflammatoire se développe progressivement sur une période de plusieurs heures à jours suivant la survenue de l'épisode ischémique, offrant ainsi une fenêtre propice aux interventions thérapeutiques.

Les approches anti-inflammatoires peuvent être distinguées en fonction de leur cible. Il est en effet possible d'intervenir soit focalement, par une inhibition ciblée de certains acteurs de la réponse inflammatoire, ou bien de façon plus globale, en jouant sur les mécanismes initiateurs de cette réponse. L'enjeu est alors de stopper la cascade des événements immunitaires et inflammatoires dès son origine. Cependant, la majorité de ces approches ont été testées dans des modèles d'AVC hémorragique ou ischémique, et les études de leurs bénéfices au décours de l'arrêt cardiaque sont encore sporadiques. Ainsi, aucun traitement pharmacologique n'a encore fait ses preuves en clinique pour prévenir le développement de séquelles neurologiques après un arrêt cardiaque et l'hypothermie reste à l'heure actuelle le seul traitement neuroprotecteur démontré [224].

1 Inhibition ciblée de certains médiateurs de la réponse inflammatoire post-arrêt cardiaque

1.1 **État de lieux des traitements déjà évalués en clinique : les glucocorticostéroïdes**

Le seul traitement anti-inflammatoire effectivement testé chez des patients réanimés concerne l'administration de corticostéroïdes. Cette catégorie de molécule est en effet connue pour inhiber la sécrétion de cytokines [225]. Les récepteurs des glucocorticostéroïdes, une fois activés, se comportent comme des facteurs de transcription et inhibent l'expression de tout un panel de gènes impliqués dans la formation de médiateurs inflammatoires (Figure 31). L'effet anti-inflammatoire est également médié par d'autres mécanismes comme l'activation de la synthèse de lipocortine-1 (un inhibiteur des phospholipases A2), avec pour conséquence la modulation de la production de médiateurs lipidiques (leucotriènes, prostaglandines. . .)[225].

Cependant, au-delà de leur activité anti-inflammatoires, les corticostéroïdes exercent également des effets hémodynamiques bénéfiques en post-arrêt cardiaque. Il a en effet été montré qu'ils contribuaient à maintenir la stabilité hémodynamique des patients en potentialisant l'effet des vasopresseurs et en augmentant ainsi les pressions de perfusion pendant et après la RCP [226, 227]. Ainsi, la plupart des études qui se sont intéressées à l'usage des corticostéroïdes en post-arrêt cardiaque, ont été conçues pour évaluer leur effet sur l'efficacité de la réanimation (i.e., administration intra-arrêt et pourcentage de réanimation comme critères primaires [228, 229]) ou bien sur la prévention de l'état de choc (causé en partie par une déficience surrénalienne) [230]. Peu d'essais cliniques ont étudié spécifiquement

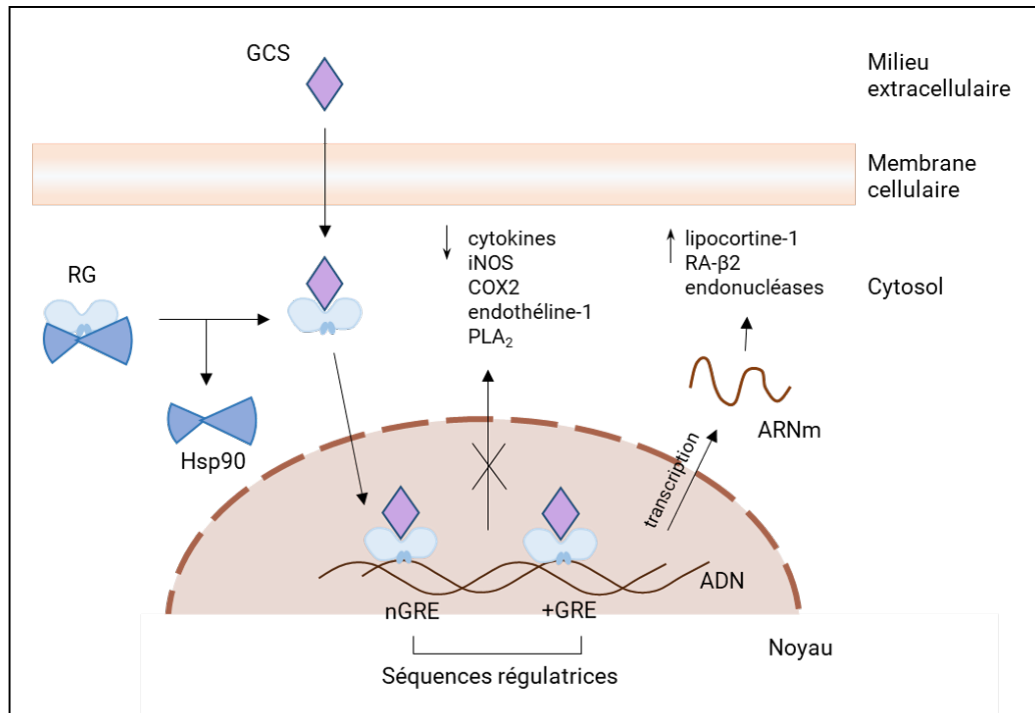


Figure 31: Mécanisme d'action des corticostéroïdes (D'après Barnes *et al.* [225]) *GCS*, glucocorticoïde ; *RG*, récepteur des glucocorticoïdes ; *HSP*, heat shock protein ; *nGRE*, élément de réponse négatif aux glucocorticoïdes ; *+GRE*, élément de réponse positif aux glucocorticoïdes ; *RA*, récepteur adrénergique ; *iNOS*, oxyde nitrique synthase inducible ; *COX*, cyclooxygénase ; *PLA*, phospholipase

l'effet des corticostéroïdes sur la prévention des lésions d'ischémie cérébrale lorsqu'ils étaient administrés après la réanimation. Une étude rétrospective publiée en 1989 a conclu à une absence d'effet de cette catégorie de molécules sur la récupération neurologique (Brain Resuscitation Clinical Trial I [4]), quelle que soit la dose administrée. Toutefois, elle incluait des patients ayant reçu un traitement tardif, jusqu'à 8 h après l'arrêt cardiaque. On peut donc supposer que l'avancement des processus lésionnels chez ces patients soit à l'origine de l'inefficacité apparente des corticostéroïdes. Donnino *et al.* ont également rapporté que l'administration d'hydrocortisone en vue de traiter l'état de choc post-arrêt ne permettait pas d'améliorer la fonction neurologique des patients ni leur taux de survie [230]. Les conclusions de cet essai doivent là encore être interprétées avec précautions en raison de son faible effectif (50 patients), d'autant plus que l'analyse des données de 145 644 patients Taïwanais issue de la Taiwan National Health Insurance Research Database a généré des résultats contradictoires [231]. Cette analyse a comparé l'évolution d'un groupe ayant reçu des corticostéroïdes au cours de la RCP à un groupe Témoin pour lequel les patients avaient été préalablement sélectionnés sur la base de multiples caractéristiques susceptibles d'influencer la réponse aux corticostéroïdes. Les patients traités par corticostéroïdes présentaient *in fine* un taux de survie supérieur à la sortie d'hôpital mais aussi 1 an après (10,8% vs 4,7%) [231].

L'absence de résultats tranchés sur le caractère neuroprotecteur des corticoïdes après un arrêt cardiaque peut s'expliquer par leurs effets métaboliques concomitants, notamment leur action hyperglycémiant potentiellement délétère pour les neurones. Des études expérimentales ont par ailleurs montré que la sur-stimulation des récepteurs aux glucocorticoïdes exacerbait les lésions hypoxiques neuronales, contrecarrant ainsi les possibles effets bénéfiques de l'inhibition de la réponse inflammatoire [232]. De plus amples études sont nécessaires pour conclure quant au potentiel des glucocorticostéroïdes lors d'ischémie cérébrale.

1.2 Stratégies expérimentales en cours d'investigation

Les données concernant les bénéfices offerts par l'inhibition ciblée de certains acteurs cellulaires ou humoraux pro-inflammatoires dérivent en quasi-totalité d'expérimentations conduites dans des modèles d'ischémie cérébrale globale ou focale.

i. Inhibiteurs de la réponse immune cellulaire.

Différentes lignées cellulaires, aussi bien la microglie résidente que les leucocytes périphériques infiltrants, sont impliquées dans la neuro-inflammation et les lésions d'ischémie-reperfusion.

Inhibition de la microglie, exemple des bénéfices de la minocycline

Durant la phase aiguë de l'inflammation, la microglie activée adopte un phénotype pro-inflammatoire (M1) et acquiert des propriétés similaires à celles des macrophages (phagocytose, présentation d'antigène et sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, d'ERO et de MMPs) [118]. L'inhibition de l'activation microgliale dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale s'est ainsi révélée prometteuse [233, 234, 235]. La plupart de ces études ont utilisé la minocycline, un dérivé de la famille des tétracyclines connu pour inhiber l'activation et la prolifération de la microglie. Toutefois les effets anti-inflammatoires de cette molécule sont en réalité relativement protéiformes et il a été montré qu'elle inhibait également la migration des neutrophiles et le relargage de leur médiateurs pro-inflammatoires [236]. Il a été constaté que l'administration de minocycline au décours d'un AVC contribuait à diminuer la taille de l'infarctus. Yrjänheikki *et al.* rapportent par exemple chez des rats soumis à 90 min d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne que l'injection intrapéritonéale de minocycline permettait de réduire le volume d'infarctus cortical de $76 \pm 22\%$ lorsqu'elle était réalisée 12 h avant l'occlusion, et de $63 \pm 35\%$ lorsque l'administration était décalée 4 h après le début de l'ischémie [235]. Ces bénéfices, en grande partie conservés lors d'une administration post-ischémique, témoignent *a priori* de la pertinence clinique de la fenêtre thérapeutique de la minocycline. Cependant, cette étude n'a pas évalué la récupération fonctionnelle de ces mêmes animaux. Les résultats obtenus avec l'administration de minocycline après la RACS dans les modèles de fibrillation ventriculaire ou d'asphyxie se sont en revanche révélés assez variables et le niveau de preuve est encore trop faible pour un transfert clinique [233, 237, 238]. En effet, si une étude réalisée sur un modèle de 8 min

de FV chez la souris décrit une diminution des lésions neuronales observées à l'histologie chez les animaux traités 30 min après la RACS [233], elle est en contradiction avec les résultats d'une autre étude réalisée par Janata *et al.* chez le rat [237]. Dans la publication correspondante, les animaux traités (avec une dose de minocycline 2 fois plus faible que dans l'autre étude) ne différaient pas des animaux témoins aussi bien sur le critère de survie que sur le critère d'atteinte histologique. Cependant, il est à noter que le traitement, dans ces conditions, n'était pas associé à une réduction de la prolifération microgliale.

Inhibition de la capacité de migration des cellules périphériques

Une autre stratégie intéressante pour limiter la neuro-inflammation après un arrêt cardiaque consiste à bloquer l'entrée des cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral. Au lieu d'agir sur la fonction des leucocytes, ce qui pourrait se révéler délétère, une alternative consiste à intervenir sur l'expression des molécules d'adhésion. Elles sont en effet indispensables à l'ancrage des leucocytes à la surface des endothéliums et contribuent également au *no-reflow* en favorisant la formation d'agrégats leucocytaires dans la microvasculature. Des travaux qui se sont intéressés aux effets du blocage de certaines classes de molécules d'adhésion exprimées par les cellules endothéliales, comme les sélectines-E, -P et ICAM-1, dans des modèles expérimentaux d'ischémie régionale ont rapporté des bénéfices neuroprotecteurs [239, 240, 241, 242]. Par exemple, le blocage des sélectines chez des primates non-humain par des anticorps monoclonaux entraînait une baisse de l'infiltration des neutrophiles dans le cortex de l'hémisphère cérébral ischémié et une diminution du volume de la zone infarctée de 41% en moyenne. Ces observations anatomiques étaient associées à une amélioration fonctionnelle chez les animaux traités, avec notamment un score de fonction neurologique amélioré de 35% [242].

Cependant le transfert clinique de la plupart de ces stratégies « anti-adhésion » s'est révélé assez décevant. En particulier, les essais cliniques menés sur les anticorps anti-ICAM-1 (enlimomab) ou anti-CD11b/18 (ligand de ICAM-1 présent à la surface des leucocytes) n'ont montré aucun bénéfice significatif chez les patients victimes d'AVC [243]. Dans la phase III de l'essai clinique conduit sur l'enlimomab, les séquelles neurologiques 90 jours après l'ischémie cérébrale étaient même plus fréquentes chez les patients traités, avec une tendance à l'augmentation de la mortalité. Les principaux effets indésirables comprenaient le développement de fièvre et d'infection, qui ont pu aggraver le pronostic neurologique des patients. Il semble donc que les anticorps ont interféré avec les défenses immunorégulatrices et favorisé le développement de processus infectieux.

Inhibition ciblée de la migration des lymphocytes

L'usage de Fingolimod (FTY720), un antagoniste des récepteurs S1P, a été proposé pour moduler la réponse immunitaire adaptative médiée principalement par les lymphocytes T effecteurs lors d'ischémie-reperfusion. Sous l'effet de la libération de DAMPs et d'antigènes cérébraux, les lymphocytes sont en effet mobilisés vers le cerveau, où ils

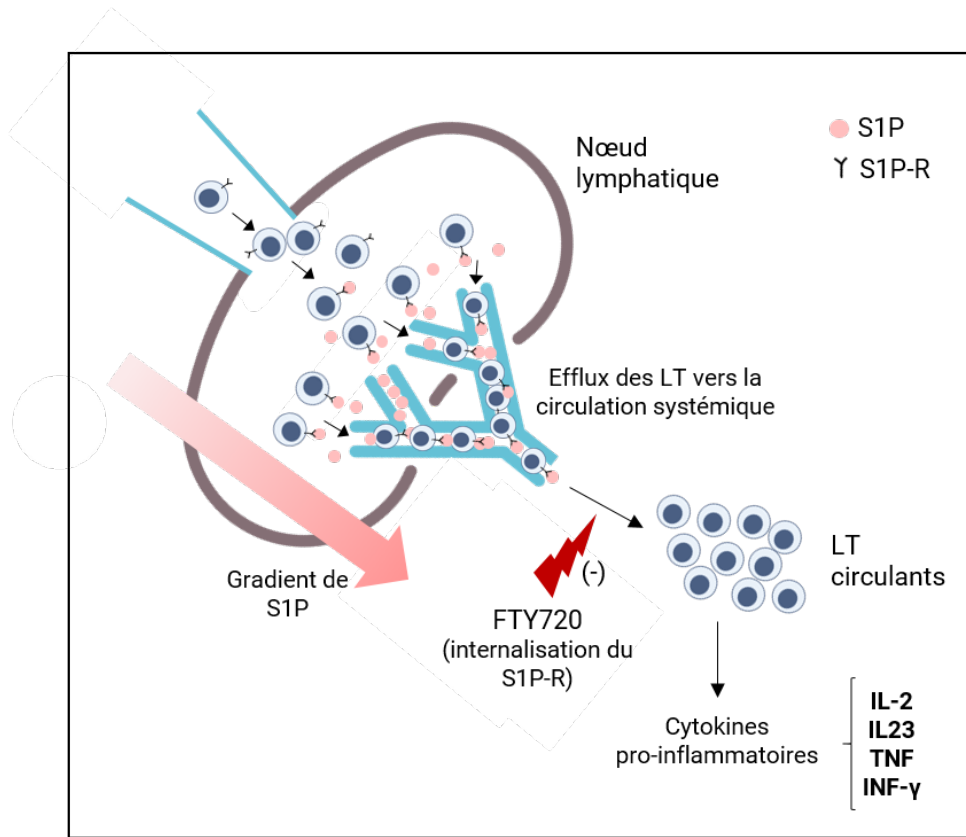


Figure 32: Mécanisme d'action du Fingolimod (ou FTY720).

S1P-R, récepteur du *S1P* ; *LT*, lymphocyte *T*, *IL*, interleukine ; *TNF*, tumor necrosis factor ; *INF*, interféron

libèrent des cytokines pro-inflammatoires et participent aux effets neurotoxiques retardés [244]. Les récepteurs S1P sont exprimés à la surface des lymphocytes CCR-7⁺ et jouent un rôle essentiel dans leur mobilisation depuis les nœuds lymphatiques vers les tissus lors d'inflammation [245]. L'administration de FTY720 permet donc d'induire une lymphopénie circulante en favorisant la séquestration des lymphocytes dans les nœuds lymphatiques. Cela permettrait *a priori* de bloquer leur passage dans le système nerveux central lors de stimulus pro-inflammatoire. Chez des rongeurs, une dose de 1 mg/kg de cette molécule administrée à 1, 24 et 48 h d'intervalle entraîne en effet une réduction de 60% des lymphocytes circulants, dès 6 h après la première administration. Le pic de suppression est ensuite maintenu pendant 7 à 9 jours [246]. Des études expérimentales ont ainsi montré que le FTY720 diminuait l'influx de leucocytes dans le cerveau et l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le contexte d'une ischémie cérébrale. Par exemple, chez les rats ayant reçu du fingolimod après 60 min d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne, l'adhésion des leucocytes aux vaisseaux cérébraux objectivée par microscopie intravitale utilisant de la rhodamine 6G, était divisée par 2 [245]. Les données obtenues dans ces mêmes modèles montrent que le FTY720 réduit par la même action la thrombose microvasculaire et la dysfonction vasculaire induite par l'ischémie-reperfusion [247].

Deux essais cliniques de petite taille ont investigué les effets du FTY720 dans l'ischémie cérébrale aiguë. Le premier, conduit en 2014, a évalué l'effet de 3 administrations consécutives de FTY720 chez 22 patients, la première dose étant administrée 1 h après la première IRM de contrôle [248]. Les patients du groupe traité par FTY720 présentaient des lésions de volume comparable à l'imagerie FLAIR (70 ± 26 vs. 85 ± 30 ml, $p = 0,69$). En revanche, le traitement était associé à une baisse de l'expansion des lésions au cours des 7 jours de suivi (9 ± 3 vs. 27 ± 8 ml, $p = 0,0494$). De même, la perméabilité vasculaire, mesurée par IRM pondéré en T1 du parenchyme cérébral, était divisée par 2. D'un point de vue fonctionnel, les patients traités par le FTY720 ont montré une amélioration significative de leur fonction neurologique dans les premières semaines de suivi, qui persistait 90 jours après l'AVC, comme indiqué par la diminution du score NIHSS. Le deuxième essai mené en 2015 sur le double de patients a retrouvé des résultats similaires avec un protocole conçu pour comparer l'efficacité d'une combinaison activateur du plasminogène tissulaire (tPA) et FTY720 par rapport au tPA seul [249].

ii. Inhibiteurs de la réponse immune humorale

Différentes approches ont également été étudiées afin d'exploiter le potentiel thérapeutique de l'immunité humorale. Cet aspect de la réponse inflammatoire post-arrêt comprend en effet une myriade de cibles d'action potentielles, dans la mesure où de très nombreux médiateurs sont alors surexprimés. L'ensemble de ces approches reste néanmoins relativement inexploré dans le contexte de la prévention des séquelles post-arrêt cardiaque.

Sur la base de l'observation que les souris KO pour les gènes responsables de la synthèse de certaines cytokines, comme l'IL-1 α/β , étaient dotées d'une plus grande résistance aux lésions ischémiques, des traitements basés sur le blocage pharmacologique de l'activité de ces cytokines ont été proposés. Il a ainsi été montré que l'administration d'antagonistes des récepteurs des IL-1, comme le rhIL-1ra, dans le striatum ou par voie systémique, permettait d'améliorer le pronostic neurologique des animaux [250, 251]. Ce traitement fait d'ailleurs actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 2 dans l'AVC ischémique [252]. En revanche, les résultats de l'inhibition ciblée d'autres cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6, malgré l'accumulation de preuves concernant leur rôle dans la physiopathologie de l'ischémie-reperfusion, sont plus contrastés. Si le blocage du TNF- α permet dans certaines conditions expérimentales de limiter les dommages cérébraux [253], d'autres études rapportent au contraire que l'inhibition de ce médiateur ou l'utilisation d'antagonistes de ses récepteurs (les TNFR) sont associées à une dégradation du pronostic neurologique chez les animaux. Par exemple, l'administration intra-cérébroventriculaire d'un anticorps monoclonal anti-TNF- α avant et pendant une occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne chez des souris, était associée à une réduction de la taille d'infarctus de 20,2% [253]. En accord avec ces premières observations, cette même étude a montré qu'une administration intra-cérébroventriculaire de TNF recombinant entraînait inversement une exacerbation dose dépendante des lésions ischémiques. Cependant, les travaux sur les souris déficientes en TNF indiquent que cette cytokine jouerait au contraire plutôt un

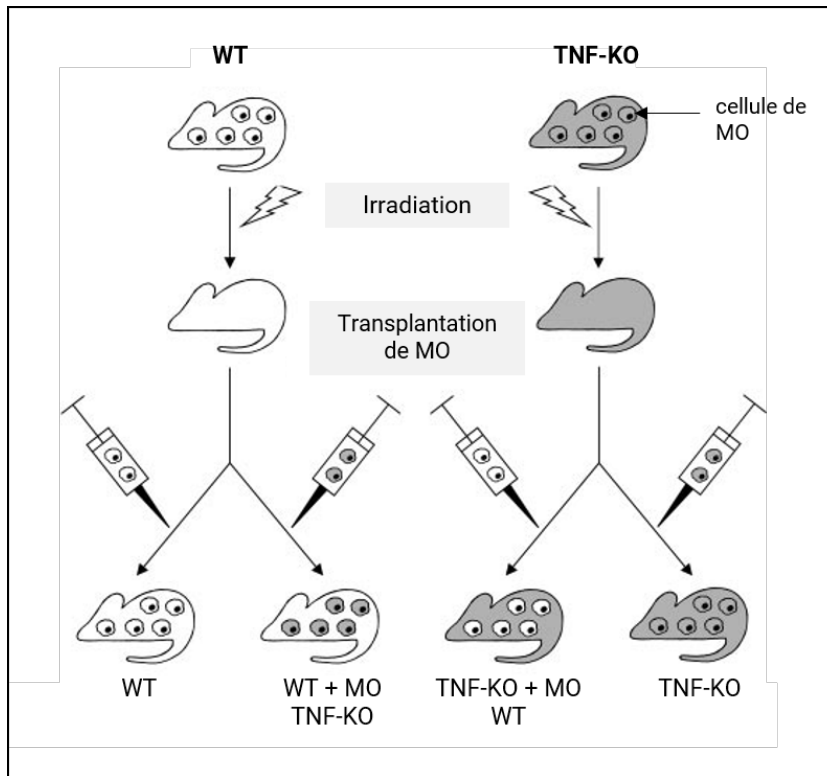


Figure 33: Protocole de manipulation génétique dans l'étude de Lambertsen *et al.* [254]
KO, knock-down ; *TNF*, tumor necrosis factor ; *MO*, moelle osseuse

rôle protecteur au décours de l'ischémie cérébrale focale [254], ainsi que dans d'autres modèles d'excitotoxicité aiguë [255]. Les effets paradoxaux de la modulation de l'activité du TNF peuvent s'expliquer par la complexité des voies de signalisation qu'il active et en particulier par les effets antagonistes médiés par ses deux principaux récepteurs, les TNF-R1 et TNF-R2. Marchetti *et al.* [255], décrivent en effet que la stimulation du TNF-R1 aggraverait la mort neuronale tandis le TNF-R2 la réduirait. Le TNF a ainsi la capacité de modifier la sensibilité des neurones à l'ischémie. De plus, il semble que les effets du TNF soient également dépendants du type cellulaire sécrétant. Après avoir montré une exacerbation des lésions ischémiques chez les souris TNF-KO par rapport au phénotype sauvage, Lambertsen *et al.* [254] ont évalué la résistance d'animaux chimères, obtenus par irradiation puis transplantation de cellules de moelle osseuse (MO) d'un autre individu (Figure 33). Ils ont ainsi montré que les souris TNF-KO ayant reçu une greffe de cellules de MO de souris sauvages développaient des infarctus plus volumineux que des souris sauvages greffées avec des cellules de MO provenant de souris TNF-KO. Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle neuroprotecteur du TNF dérivé de la microglie, mais pas des leucocytes sanguins.

Dans les modèles d'ischémie cérébrale, la modulation de l'activité de l'IL-6 produit également des effets ambivalents, alors même que les niveaux circulants en IL-6 après un AVC sont étroitement corrélés au pronostic neurologique des patients [256]. Si des travaux suggèrent qu'une thérapie anti-IL-6 réduit le risque de formation d'un thrombus cérébral

lors d'accident ischémique bref (5 min) [257], d'autres études plaident au contraire pour le potentiel neuroprotecteur d'une administration d'IL-6. Des expériences de supplémentation précoce en IL-6 dans un modèle d'occlusion permanente de l'artère cérébrale moyenne, montrent en effet que si l'IL-6 ne modifie pas la taille d'infarctus des souris traitées, elles présentent tout de même une meilleure récupération fonctionnelle [258].

Des tentatives de blocage de certaines chimiokines clés sont également décrites dans la littérature. Cependant, ces médiateurs apparaissent une fois encore comme des cibles à double tranchant. En mobilisant les cellules inflammatoires, ils contribuent directement à exacerber la neuro-inflammation et à altérer la BHE. Néanmoins, ils jouent également un rôle important dans la résolution des phénomènes inflammatoires. On peut par exemple citer le cas de MCP-1, une des principales chimiokines mises en jeu dans l'ischémie cérébrale aiguë [159, 259, 260]. Une étude a évalué l'effet de l'administration de propargemanium, un inhibiteur pharmacologique du récepteur CCR2 chez des souris soumises à une ischémie cérébrale focale de 45 min [261]. Après avoir montré que le recrutement des monocytes vers le territoire ischémié était CCR-2 dépendant, les auteurs ont suivi l'évolution de la taille d'infarctus au cours du temps par IRM. L'étude a ainsi montré que si l'inhibition du CCR2 était associée dans un premier temps à une diminution de la taille d'infarctus 72 h après la reperfusion par rapport aux animaux témoin, elle aboutissait dans un second temps, lors de la réévaluation à 14 j, à un infarctus de plus grande taille chez les animaux traités. *In fine*, les animaux traités présentaient également une moindre récupération fonctionnelle. Les monocytes recrutés sur le site ischémié apparaissent donc essentiels à long terme. Dans cette même étude, les auteurs montrent d'ailleurs que l'inhibition de la mobilisation monocyttaire se traduit par une baisse drastique de l'expression de gènes anti-inflammatoires (TGF, CD163, et Ym). Les monocytes circulant interviendraient donc dans la transition d'un phénotype inflammatoire vers un phénotype anti-inflammatoire au cours de la phase tardive de l'AVC. MCP-1 semble également impliqué dans la mobilisation des cellules souches [262]. Ainsi, si un blocage précoce de l'action des chimiokines peut être salvateur lors d'ischémie aiguë [263], le maintien sur une période prolongée entraînerait une bascule vers des conséquences délétères.

Il a aussi été montré que l'inhibition concomitante de l'activité des MMP-2 et -9 était protectrice [264, 265]. Cependant, les interventions affectant la fonction des MMP doivent être utilisées avec précaution dans la mesure où elles jouent, tout comme les chimiokines, un rôle supposé bénéfique dans la phase de récupération post-ischémie [266]. Leur action sur la matrice cérébrale est en effet nécessaire pour la mise en œuvre du remodelage neuro-vasculaire.

Enfin, on peut citer les investigations qui ont été menées sur le potentiel thérapeutique de divers médiateurs anti-inflammatoires. Il a notamment été montré que l'augmentation des niveaux d'IL-10 était protecteur lors d'ischémie cérébrale focale chez l'animal, mais aucune étude clinique n'a encore été conduite sur ce sujet [267, 268, 269]. Si dans les études précliniques, l'IL-10 tend en effet à réduire la taille d'infarctus via des effets protecteurs sur l'endothélium et une atténuation de la sécrétion de médiateurs inflammatoires, des

études cliniques qui ont mesuré les niveaux d'IL-10 chez les patients après un AVC mettent notamment en évidence une possible corrélation entre les niveaux d'IL-10 circulant et la survenue de complications infectieuses [270]. Dans ce contexte, l'élévation précoce des niveaux d'IL-10 favoriserait la survenue d'un état d'immunodépression chez les patients, les rendant ainsi plus sensibles aux agents pathogènes. De même, des travaux ont montré que la surexpression de TGF- β et d'IGF-1 inhibait l'activité des lymphocytes Th1 et Th2, tout en promouvant l'expansion des populations de lymphocytes T régulateurs. La modulation de ces signaux pourrait ainsi permettre de rétablir un environnement cérébral propice aux processus réparateurs [271, 272].

En résumé, les résultats des thérapies ciblées sur l'immunité humorale en post-ischémie sont globalement assez décevants, voire même surprenants pour les molécules d'adhésion avec des effets secondaires non anticipés. La complexité et la multitude des événements mis en jeu une fois la cascade inflammatoire avancée ainsi que les interactions méconnues entre ses différents acteurs semblent en effet peu compatibles avec l'utilisation de stratégies pharmacologiques « mono-cibles », d'autant plus que la réaction inflammatoire faisant suite à une ischémie-reperfusion aiguë est ambivalente. Elle est à la fois responsable de l'exacerbation des lésions neurologiques et nécessaire à la réparation du tissu ischémié. Les traitements immunomodulateurs doivent donc permettre d'inhiber la composante inflammatoire destructrice tout en maintenant les phénomènes bénéfiques. Dans cette optique, la fenêtre d'intervention apparaît essentielle. La réponse inflammatoire respecte en effet un motif chronologique et évolue rapidement au cours du temps. Les traitements modulant l'activité des médiateurs immunitaires prodiguent ainsi des résultats variables en fonction du moment d'administration et doivent être, dans l'idéal, administrés le plus précocement possible afin d'en limiter les effets à la phase pro-inflammatoire aiguë. Une intervention menée très en amont dans la cascade inflammatoire, notamment ciblée sur les processus initiateurs, pourrait constituer une alternative intéressante pour endiguer les phénomènes inflammatoires délétères sans pour autant priver le patient d'une réponse immunitaire adéquate et nécessaire à plus long terme.

2 Effet de l'inhibition des événements initiateurs de l'initiation de la réponse immune par les DAMPs

Dans le cerveau, en amont dans la cascade d'évènement initiée par l'ischémie-reperfusion, les DAMPs sont libérés par les neurones dégénérescents, mais également dans tout l'organisme. Ils jouent notamment un rôle important dans l'activation de l'immunité innée. Leur inhibition pourrait donc permettre d'endiguer le cercle de perpétuation des dommages vasculaires et de l'inflammation à l'origine d'une seconde vague de mortalité cellulaire lors d'arrêt cardiaque.

Dans cette optique de nombreux antagonistes des principaux récepteurs de l'immunité innée, les TLR, sont actuellement en cours de développement. Il s'agit pour la plupart d'analogues structuraux des ligands des TLR, qui agissent en se liant aux récepteurs mais sans induire de transduction de signal [273]. Néanmoins, ces inhibiteurs ont été initialement

développés pour la prise en charge du sepsis. Dans le contexte de l'ischémie-reperfusion, les preuves de leurs bénéfices ont été récemment documentées dans de multiples modèles d'atteinte régionale (myocardique, hépatique, rénal...)[274]. Tang *et al.* ont également montré que les TLR2 et 4 jouaient un rôle pivot dans les lésions d'ischémie cérébrale en mettant en lumière par la même occasion l'importance des TLR neuronaux [275]. En effet, en conditions physiologiques les neurones expriment un large panel de TLRs, mais après 1 h d'ischémie, il a été démontré qu'ils surexprimaient plus sélectivement les TLR2 et 4. *In vitro*, les neurones issus de souris déficientes en TLR2 et TLR4 sont alors plus résistants aux privations énergétiques. Ces résultats suggèrent que la prévention des lésions ischémiques obtenues grâce à l'inhibition des TLR ne repose pas uniquement sur le blocage de l'inflammation initiée par les cellules gliales ou les leucocytes infiltrants mais également sur un effet protecteur direct des neurones.

Les TLR2 et TLR4 semblent également contribuer au syndrome post-arrêt cardiaque. On peut par exemple mentionner les résultats d'une étude clinique qui s'est intéressée à la signalisation PRR-dépendante des monocytes circulants précocement après la réanimation [276]. Elle documente une surexpression des TLR2 et TLR4 par les monocytes, dont les niveaux étaient bien corrélés au degré d'ischémie tissulaire des patients, objectivé par la concentration sanguine des lactates et par la durée cumulée de *no-flow* et *low-flow*. Par ailleurs, les patients décédés au cours des 30 premiers jours de suivi tendaient à présenter une expression supérieure des TLR à 12 h post-RACS, bien que la différence n'ait pas été significative. De multiples essais ont ainsi été menés chez des rongeurs au cours des 5 dernières années, afin d'évaluer l'effet du blocage des TLR après un arrêt cardiaque. Tout d'abord, il est apparu que les souris déficientes en TLR4 étaient effectivement plus résistantes à une courte période de *no-flow*. Dans un modèle d'arrêt cardiaque induit par surcharge potassique avec un *no-flow* de 3 min, le taux de mortalité des souris présentant une mutation invalidant le gène codant pour le TLR4 était inférieur à celui des animaux non modifiés génétiquement 3 jours après l'arrêt cardiaque (33,3 vs 53,3%, respectivement) [277]. L'amélioration de la survie était également associée à une moindre extension des lésions neuronales à l'histologie et à une diminution de la neuro-inflammation (TNF- α = $6,85 \pm 1,19$ ng/mL vs $11,36 \pm 2,12$ ng/mL dans l'hippocampe, respectivement). Le potentiel du TLR4 comme cible thérapeutique a été corroboré par des expériences de blocage pharmacologique, grâce à différents inhibiteurs comme la (+)-naltrexone [278, 279]. Toutefois, une approche de blocage plus spécifique du TLR4 avec anticorps monoclonal administré immédiatement après la RACS a donné des résultats divergents [280]. La survie et la récupération neurologique, évaluées 28 jours après l'arrêt cardiaque, étaient similaires entre les animaux traités et non traités. En utilisant la même stratégie inhibitrice et un modèle comparable, le même laboratoire a en revanche montré que l'inhibition du TLR2 produisait des effets neuroprotecteurs [281]. D'autres études sont désormais nécessaires afin de pouvoir généraliser ces observations et de déterminer le potentiel synergique d'une inhibition simultanée des TLR2 et -4 dans le traitement des séquelles de l'arrêt cardiaque.

Une autre approche pour bloquer les effets de la signalisation des PRRs consiste à inhiber de façon ciblée certains DAMPs considérés comme des contributeurs majeurs aux

lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale, comme HMGB1 ou la famille des peroxiredoxines. Cependant, si le rôle de HMGB1 a été mis en évidence très précocement au décours de ce type d'agression, les peroxiredoxines semblent plutôt intervenir durant la phase subaiguë de la maladie, essentiellement lors la propagation de la pénombre ischémique [282]. De nombreuses approches ont été étudiées afin de bloquer l'activité de HMGB1 et ses conséquences pro-inflammatoires (Figure 34). Certaines sont basées sur des antagonistes compétitifs de la fixation de HMGB1 sur RAGE, comme la box A recombinante, un analogue du domaine de HMGB1 reconnu par RAGE mais dépourvu d'effet, ou bien des anticorps anti-RAGE. Des résultats encourageants ont également été obtenus avec des composés de nature chimique variée, se liant directement à HMGB1 tels que la glycyrrhizine (Figure 35), le gabexate mesilate ou des anticorps anti-HMGB1 [103]. La glycyrrhizine est l'un des inhibiteurs de HMGB1 les plus étudiés dans le contexte de la prévention des lésions d'ischémie-reperfusion. Il s'agit d'un triterpène naturel trouvé dans la racine de réglisse. Il agit par liaison directe aux 2 domaines « box » de HMGB1 et inhibe ainsi ses propriétés chémoattractives et mitogénique [103]. Cette molécule a démontré des effets protecteurs dans de nombreux organes (moelle épinière, myocarde, foie, cerveau) [103]. Par exemple, l'administration intraveineuse de glycyrrhizine 3 à 6 h après une occlusion transitoire de l'artère cérébrale moyenne permettait de diminuer la taille d'infarctus de $12.9 \pm 4.2\%$ et $46.2 \pm 9.9\%$ par rapport au groupe témoin, respectivement [283]. Cependant, l'effet protecteur de la glycyrrhizine ne semblait que partiellement médié par l'inhibition de la sécrétion de HMGB1 par la microglie, liée au blocage des sites de phosphorylation de HMGB1 nécessaires à sa sécrétion active. Les auteurs ont en effet montré que la glycyrrhizine exerçait également une action anti-excitotoxique et anti-oxydative sur les neurones. Dans d'autres études, les effets neuroprotecteurs de l'inhibition de HMGB1 étaient toutefois moins évidents. Par exemple, dans l'étude de Liesz *et al.* [87], l'utilisation d'anticorps anti-HMGB1 n'entraînait ni diminution de la taille d'infarctus, ni amélioration du score de dysfonction neurologique. Néanmoins, les auteurs ont tout de même observé une tendance à la diminution de la mortalité chez les animaux traités. L'effet de l'inhibition de HMGB1 dans ce modèle ne serait donc possiblement pas lié à une neuroprotection structurale immédiate mais plutôt à l'inhibition des conséquences systémiques de l'infarctus. Au-delà de l'inhibition de HMGB1, la glycyrrhizine exerce en effet une multitude d'effets biologiques. Elle est par exemple connue pour son action de type mineralocorticoïde liée à l'inhibition de l'enzyme responsable de la conversion du cortisol en cortisone, la 11- β -hydroxysteroïde déshydrogénase de type 2 [284]. Elle est aussi étudiée pour ses propriétés anti-virales [31]. Or, ces effets sont susceptibles d'interférer avec les mécanismes pathologiques mis en œuvre au décours d'un arrêt cardiaque, en particulier lors du développement d'insuffisance surrénalienne [285].

Dans le contexte de l'arrêt cardiaque, HMGB1 est probablement le DAMP qui a été le plus amplement investigué et modulé au cours des dernières années. Chez l'homme, sa libération précoce après un arrêt cardiaque est étroitement corrélée au pronostic neurologique [3, 2]. Expérimentalement, il semblerait que l'inhibition rapide de HMGB1 permette d'abolir une partie de la réponse immunitaire innée induite par l'arrêt cardiaque et de limiter la dysfonction neurologique associée. Deux études ont été menées sur des rongeurs, l'une chez

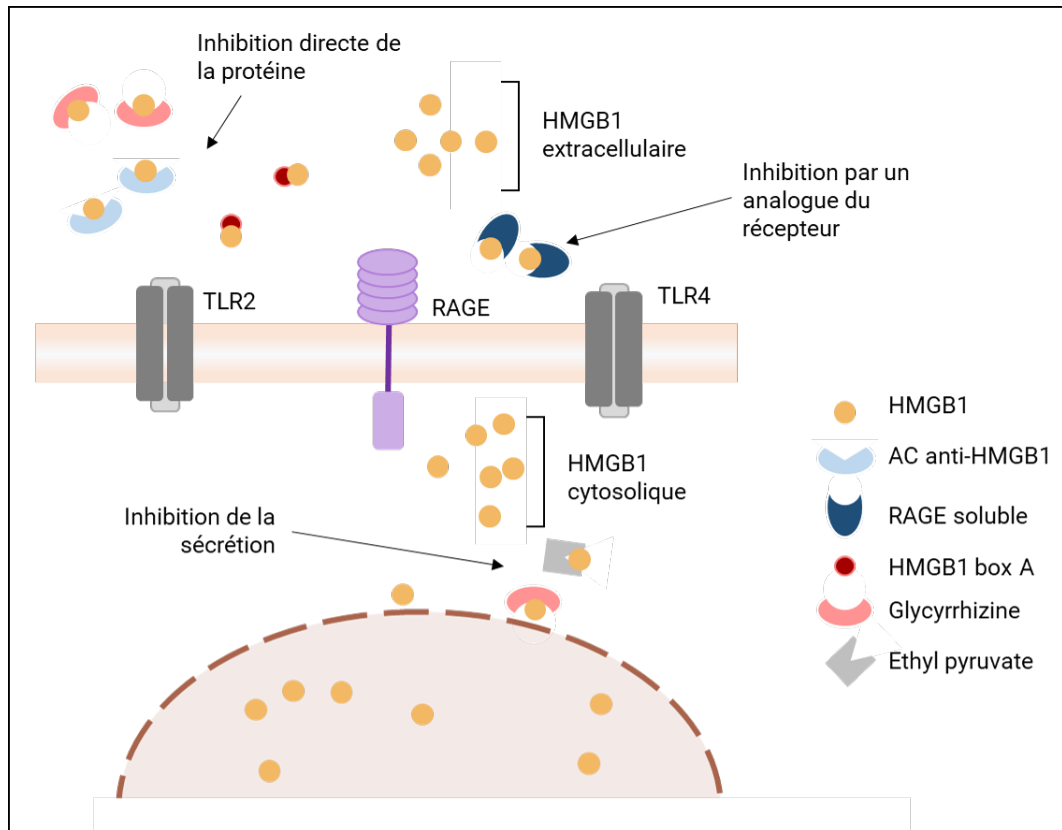


Figure 34: Cibles potentielles pour l'inhibition pharmacologique de HMGB1 (D'après He *et al.* [286])

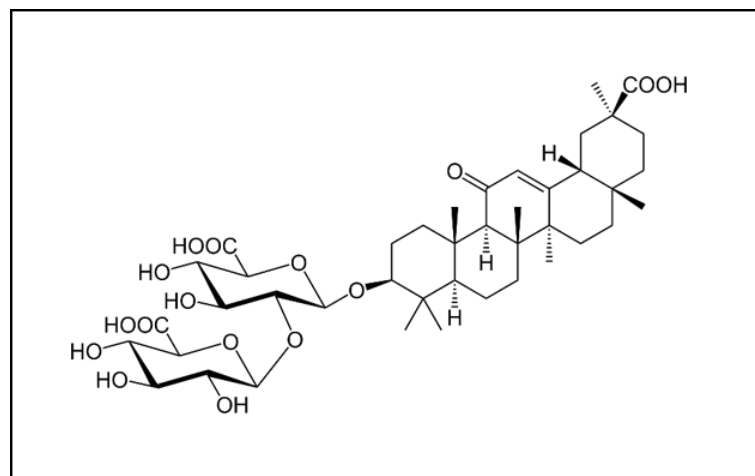


Figure 35: Structure moléculaire de l'acide glycyrrhizique.

des rats soumis à 6 min de FV induite par un courant alternatif intra-œsophagien [115], et l'autre chez des rats soumis à 8 min d'asphyxie [287]. Dans le premier protocole, un anticorps anti-HMGB1 a été administré par voie intra-cérébroventriculaire immédiatement après la réanimation. Les auteurs ont observé une diminution du score de dysfonction neurologique tout au long du suivi et une préservation de l'intégrité des neurones dans l'hippocampe chez les animaux traités. Ces bénéfices étaient associés à une baisse des concentrations tissulaires en IL-1 β et en TNF- α dans l'hippocampe, suggérant un mécanisme protecteur basé sur la réduction de la neuro-inflammation. Dans la deuxième étude, le blocage de la signalisation de HMGB1 était assuré grâce à un peptide héptamérique se liant directement à HMGB1 (HBHB) et optimisé pour franchir la BHE après une administration intraveineuse. Ils ont ainsi obtenu des résultats très similaires à ceux de l'étude précédente avec une amélioration de la survie à 7 jours (53,7% vs 80,8%), une diminution du déficit neurologique associé à une préservation des neurones et des dendrites dans la région CA1 de l'hippocampe. Là aussi, même si la molécule était administrée dans le compartiment sanguin, une baisse de la neuro-inflammation était observée avec une moindre activation de la microglie et des astrocytes et une diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires dans la région CA1 de l'hippocampe. Ces études soulignent l'importance de l'axe HMGB1/PRR dans les lésions cérébrales induites par l'arrêt cardiaque et l'intérêt de stratégies inhibitrice chez les patients réanimés.

Malgré l'émergence de nombreuses preuves précliniques, mais aussi cliniques, du rôle de l'activation du système immunitaire et de la cascade inflammatoire qui en découle dans la pathogenèse des lésions neurologiques au décours du syndrome post-arrêt, le contrôle ciblé de la température reste à l'heure actuelle le seul traitement ayant fait la preuve de son efficacité chez l'homme. Au cours de la dernière décennie, un nombre croissant de composés anti-inflammatoires et immunomodulateurs ont démontré un potentiel neuroprotecteur prometteur en conditions expérimentales. Cependant, ces stratégies doivent encore être précisées et raffinées afin de pouvoir améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients après un arrêt cardiaque.

Conclusion

L'arrêt cardiaque est le point de départ d'une cascade inflammatoire qui repose sur une activation initiale de l'immunité innée similaire à celle observée lors de l'intrusion d'agent pathogène dans l'organisme. Elle met notamment en jeu le relargage par les tissus endommagés de signaux pro-inflammatoires endogènes, les DAMPs. Ces molécules déclenchent une réponse inflammatoire systémique, caractérisée par une activation neutrophilique, l'élévation des concentrations cytokiniques plasmatiques ainsi que la formation de lésions endothéliales sévères. Dans le contexte de l'arrêt cardiaque réanimé, HMGB1 semble jouer un rôle tout particulier dans le développement de ces processus pathologiques, qui se traduisent en outre par des désordres microcirculatoires et à une fuite vasculaire pouvant aboutir à une présentation clinique similaire à celle du choc septique. Par ailleurs, les DAMPs déclenchent également une neuro-inflammation qui, en interaction avec le système immunitaire périphérique, contribue à la propagation des lésions neuronales et à l'aggravation du pronostic neurologique des patients.

Au cours de la dernière décennie, un nombre croissant de composés anti-inflammatoires et immunomodulateurs ont démontré un potentiel neuroprotecteur prometteur en conditions expérimentales d'ischémie-reperfusion. Cependant, malgré des résultats précliniques positifs, la complexité et l'ambivalence des processus inflammatoires mis en jeu rendent leur modulation décevante, et parfois même contre-productive dans un contexte clinique. L'approche qui consiste à intervenir sur les signaux initiateurs de l'inflammation pourrait ainsi constituer une piste intéressante pour agir plus efficacement tout en limitant les effets secondaires imprévisibles observés avec les traitements anti-inflammatoires classiques. Pour ce faire, des molécules susceptibles d'inhiber la libération des DAMPs ou leur signalisation ont par exemple été spécifiquement développées. Il existe également des molécules dont les effets pharmacologiques sont connus de longue date mais qui sont moins spécifiques, comme c'est le cas de la glycyrrhizine, un inhibiteur de HMGB1. Peu d'investigations pré-cliniques dans des modèles d'arrêt cardiaque ont pour le moment été menées.

L'hypothermie thérapeutique, ou a minima le contrôle ciblé de la température, reste à l'heure actuelle, le seul traitement ayant fait la preuve de ses bénéfices chez l'homme. Si l'hypothermie semble exercer une action anti-inflammatoire, peu d'études ont investigué son effet sur les événements initiateurs du syndrome inflammatoire post-arrêt, notamment sur l'activité des DAMPs. Or, cela pourrait contribuer à expliquer la moindre efficacité des dispositifs hypothermisants utilisés en clinique, par rapport à ce qui a été décrit en conditions expérimentales, du fait du délai nécessaire pour atteindre la température cible. La VLT constitue une approche intéressante pour accélérer l'induction du refroidissement

chez l'homme et ainsi maximiser son potentiel neuroprotecteur. Le principal obstacle à l'utilisation clinique de la VLT reposait sur l'absence de ventilateur dédié. Cependant au cours des dernières années, les défis technologiques ont été surmontés par le laboratoire d'accueil, qui a contribué à la mise au point un prototype adapté à la ventilation de patients adultes. Il doit désormais démontrer la tolérance de la procédure et préciser les conditions d'application les plus pertinentes en vue d'un futur essai clinique.

PARTIE II:
ÉTUDES EXPÉRIMENTALES

Objectifs de la thèse

Au cours des dernières années, le laboratoire d'accueil a élaboré un nouveau paradigme d'institution de l'hypothermie par le développement de l'hypothermie ultra-rapide par VLT au décours de l'arrêt cardiaque. Le bénéfice de cette approche a été montré dans divers modèles expérimentaux de syndrome post-arrêt cardiaque. Sa supériorité par rapport à des méthodes de refroidissement plus lentes étant aujourd'hui démontrée chez l'animal, le laboratoire souhaite transférer cette approche en clinique afin d'en valider la pertinence chez les patients. Néanmoins, lorsque j'ai débuté cette thèse, différentes questions sur les conditions précises d'emplois de la VLT devaient encore être examinées, notamment concernant sa fenêtre thérapeutique et son mécanisme d'action. Dans les modèles d'arrêt cardiaque étudiés par le laboratoire, les bénéfices de la VLT avaient alors été décrits lorsqu'elle était instaurée dans les 20-30 min suivant la réanimation des animaux, alors qu'un refroidissement externe plus lent était peu efficace [10]. Ces observations suggéraient que des processus décisifs pour le développement du syndrome post-arrêt avaient lieu très rapidement après la réanimation et que l'hypothermie n'était plus susceptible de les inhiber au-delà d'un temps seuil. L'objectif de ma thèse était ainsi de préciser les bases physiopathologiques de l'action de l'hypothermie ultra-rapide par VLT. Plus précisément, nous avons cherché à comprendre si l'activation inflammatoire précoce conditionnait l'efficacité de la VLT dans l'arrêt cardiaque.

Pour cela, nous avons tout d'abord mené une étude qui visait à définir les paramètres ventilatoires les plus adéquats à la réalisation d'une VLT. L'objectif était de comparer la tolérance pulmonaire, à court et moyen termes, de différentes modalités de VLT afin de sélectionner celles qui offraient la meilleure combinaison tolérance/efficacité. Ces travaux ont permis au laboratoire de conceptualiser une nouvelle méthode ventilatoire basée sur le remplissage incomplet des poumons avec les PFC, en opposition avec ce qui était préconisé jusque là. À titre personnel, j'ai démontré l'innocuité et les effets neuroprotecteurs de cette approche dans un modèle d'arrêt cardiaque pédiatrique que nous avons préalablement développé chez le porcelet. Cette étude a été incorporé dans un corpus plus large afin d'aboutir à la démonstration du concept de « lung-conservative liquid ventilation », comme nous le verrons plus loin. Par la suite nous avons donc formulé l'hypothèse selon laquelle la VLT exercerait une partie de ses effets en inhibant le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque, par une atténuation de la mortalité cellulaire initiale et de la libération des DAMPs. Cette hypothèse apparaissait d'autant plus probable que l'hypothermie était connue pour inhiber les mécanismes lésionnels initiés par l'ischémie-reperfusion (stress oxydant, excitotoxicité...). Pour réaliser l'étude correspondante nous avons choisi d'utiliser

un modèle expérimental d'arrêt cardiaque choquable chez le lapin dans des conditions identiques à celles utilisées dans la première preuve de concept de l'effet de la VLT [8]. Enfin, dans une dernière étude, nous avons évalué si l'inhibition spécifique et directe d'un DAMP après la réanimation était également à l'origine d'une neuroprotection et si cela pouvait constituer une cible thérapeutique pertinente à part entière. Nous nous sommes plus particulièrement concentré sur le blocage de HMGB1, un DAMP nucléaire qui semble jouer un rôle central dans la propagation des dommages neuronaux au décours d'une ischémie-reperfusion. Elle a en effet été identifiée comme un contributeur majeur de la neuro-inflammation dans des modèles d'AVC mais aussi d'ischémie globale. Des études cliniques ont également mis en évidence une association entre les niveaux plasmatiques de HMGB1 des patients à leur admission et leur récupération neurologique [Sugita ; Omura]. Notre hypothèse était donc qu'une inhibition très précoce de la cascade immunitaire en agissant sur l'activité de ce DAMP pourrait limiter la dysfonction neurologique après l'arrêt cardiaque. Nous avons évalué l'effet d'un blocage ciblé de HMGB1 par une administration de glycyrrhizine, un agent pharmacologique connu pour inhiber de façon concomitante la libération et l'activité de la HMGB1 extracellulaire. Ces travaux ont été menés sur le même modèle de fibrillation ventriculaire chez le lapin utilisé dans l'étude précédente.

Chapitre 1

Matériel et méthodes

A. Conditions générales des expériences

Les travaux présentés dans cette thèse ont été conduits dans l'équipe 3, Institut Mondor de la Recherche Biomédicale (IMRB), UMR-S955, Inserm, UPEC, ENVA.

1 Aspects réglementaires

Toutes les expériences ont été menées conformément à la législation française régissant l'expérimentation animale (agrément de l'établissement A94-043-13). L'ensemble des procédures proposées dans ce projet ont été approuvées par le comité d'éthique « Cometh Anses/ENVA/UPEC (n°16) ».

2 Animaux

Les premiers travaux ont été réalisés sur des porcelets mâles et femelles de poids compris entre 1,3 et 4,4 kg (âgés de 3 à 20 jours). Toutes les autres études ont été conduites sur des lapins mâles de race New Zealand d'un poids compris entre 2,5 et 3,5 kg.

3 Protocoles anesthésiques

Pour chacune des espèces étudiées, l'ensemble des expériences a été réalisé à l'aide d'un protocole anesthésique standardisé. Dans tous les cas, après l'induction anesthésique, les animaux ont été intubés à l'aide d'une sonde endotrachéale de 3,5 mm de diamètre. Ils ont ensuite été placés sous ventilation mécanique (10 ml/kg de volume courant avec une fréquence de 30 cycles/minute; Minerve, Esternay, France). Sauf mention contraire, la fraction inspirée d'oxygène (FiO_2) délivrée aux animaux était fixée à 30%.

3.1 Protocole d'anesthésie des porcelets

Les animaux étaient anesthésiés avec un mélange de zolazépan et tilétamine (Zoletil® ; 12,5 mg/kg i.m.), associé à une administration de propofol (Propovet® ; 25 mg/kg i.v.).

Les animaux ont également été curarisés par administration de vecuronium (Norcuron® ; 0,2 mg/kg i.v.) et ont reçu de la buprénorphine (Temgesic® ; 0,03 µg/kg i.v.) à visée analgésique.

3.2 Protocole d'anesthésie des lapins

Les animaux ont été anesthésiés avec un mélange de zolazépam et de tilétamine (Zoletil® ; 12,5 mg/kg i.v.), avant l'administration de pentobarbital (20mg/kg i.v.). Ils ont également été paralysés par une administration de rocuronium (Esmeron® ; 1 mg/kg, i.v.) et ont reçu de la buprénorphine (Temgesic® ; 0,03 µg/kg i.v.) à visée analgésique.

B. Modèle d'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale chez le porcelet

Ce modèle a été utilisé afin d'étudier l'effet neuroprotecteur éventuel d'une hypothermie ultra-rapide par VLT après un arrêt cardiaque pédiatrique. Nous avons ainsi développé un modèle d'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale (EAI) avec une induction en deux temps. L'enjeu était d'induire des séquelles neurologiques suffisamment marquées afin de pouvoir objectiver les bénéfices du traitement, tout en limitant le taux d'échec de la procédure. Il a été ainsi décidé d'utiliser des porcelets âgés de plusieurs jours, mais de poids similaire à celui d'un nourrisson. Les travaux correspondants ont par la suite été intégrés à un corpus d'études, réalisées sur différents modèles et différentes espèces, démontrant la tolérance et l'efficacité d'une VLT réalisée selon une approche innovante développée par le laboratoire d'accueil.

1 Préparation des animaux

Une fois les animaux anesthésiés et ventilés, un cathéter veineux et un cathéter artériel étaient insérés dans la veine marginale de l'oreille et dans l'artère fémorale. Quatre électrodes cutanées ont été fixées afin de suivre l'électrocardiogramme (ECG) pendant toute la durée du protocole. Une sonde de capnographie a été reliée à la sonde endotrachéale et une sonde d'oxymétrie de pouls a été placée sur la langue.

2 Expériences préliminaires pour la mise au point du modèle

Une première série d'expérience a été conduite afin de mettre au point un protocole standardisé d'hypoxie-ischémie conduisant à des modifications biochimiques et cliniques s'apparentant à celles observées chez les nourrissons atteints d'EAI, avec notamment des séquelles neurologiques viables et stables dans le temps. D'une manière générale, les nouveau-nés sont connus pour être très résistants à l'hypoxie seule. Ils ne développent des lésions cérébrales que si la privation d'oxygène s'accompagne d'une ischémie. Nous avons ainsi opté pour un protocole constitué d'un épisode d'hypoxie suivi d'une phase d'apnée. Après avoir fixé la durée de l'hypoxie à 30 min, avec une FiO_2 de 10%, sur la base des modèles présentés dans la littérature, il nous a fallu déterminer la durée la plus adéquate pour le maintien de l'apnée. Nous avons ainsi soumis des porcelets à une hypoxie (30 min à FiO_2 à 10%) suivie d'un épisode asphyxique fixé aléatoirement à 5, 7 ou 10 min ($n = 3$ dans chaque groupe). Au cours de cette période, la pression artérielle et l'ECG ont été évalués en continu. Après la RCP, les animaux ont été réveillés et suivis sur une période de 7 jours, à l'issue de laquelle les survivants étaient euthanasiés.

Aucun des porcelets soumis à 10 min d'apnée n'a pu être réanimé. Les autres ont présenté une hypotension progressive au cours de l'apnée et la pression artérielle moyenne (PAM) atteignait des valeurs < 30 mmHg quelques min avant la RCP. L'activité électrique cardiaque était aussi fortement dégradée avec une bradycardie sévère. Parmi les porcelets soumis à 5 min d'apnée, aucun ne présentait de trouble neurologique au lendemain du

protocole. En revanche, dans le groupe soumis à 7 min d'apnée, les animaux ont présenté des troubles neurologiques d'intensité variable, allant d'un état comateux avec absence de mouvement volontaire à l'absence de séquelle neurologique objectivable à l'examen clinique des animaux. La durée de 7 min d'apnée semblait donc constituer un bon compromis entre sévérité du protocole et survie des animaux. Elle a été adoptée pour la suite des expérimentations.

3 Anoxo-ischémie et procédure de réanimation

Après une période de stabilisation, l'hypoxie-ischémie était induite en deux temps conformément aux résultats des expériences préliminaires. Dans un premier temps la FiO_2 était diminuée à 10%, sans modification des autres paramètres ventilatoires. L'hypoxie était maintenue pendant 30 min. Au terme de cette période, les animaux étaient directement soumis à 7 min d'asphyxie par déconnection de la sonde endotrachéale du ventilateur mécanique et clampage de son extrémité. Au terme des 7 min, la sonde endotrachéale était déclampée et reconnectée au ventilateur mécanique de façon à fournir un flux constant d'oxygène pur, et une RCP était initiée par massage cardiaque externe (200 battements par min) et administration d'adrénaline (15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i.v.). La RCP était poursuivie jusqu'à la reprise d'une activité cardiaque spontanée (RACS), c'est-à-dire l'observation d'une pression artérielle systolique supérieure à 40 mmHg pendant au moins 1 min. Après la RACS, les animaux ont été maintenus sous ventilation artificielle, en modulant la FiO_2 de façon à conserver une SpO_2 supérieure à 90% jusqu'à leur réveil et leur respiration spontanée. En cas de besoin, une administration i.v. continue d'adrénaline était mise en place afin de maintenir une valeur de PAM > 70 mmHg tout au long du suivi.

4 Paramètres étudiés

4.1 Monitoring des constantes vitales (hémodynamiques, respiratoires et thermiques)

L'ECG des animaux a été recueilli tout au long de la procédure grâce à des électrodes cutanées reliées à un amplificateur (Gould Instruments Inc., Cleveland, OH, Etats-Unis). La fréquence cardiaque a été calculée à partir du signal ECG. La pression artérielle systémique a été mesurée grâce au cathéter artériel fémoral, connecté à un capteur de pression (Statham P23ID, Statham Instruments, Croissy-sur-Seine, France). La PAM a été calculée à partir des pressions artérielles systolique et diastolique. Les signaux électrocardiographiques, de pression artérielle, et de pression respiratoire ont été visualisés, enregistrés et analysés à l'aide du logiciel d'acquisition et de traitement du signal HEM 3.5 (Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, France). La fréquence cardiaque et la pression artérielle ont ainsi été régulièrement mesurées avant, durant et après l'anoxo-ischémie. La température rectale et oesophagienne des porcelets a également été mesurée régulièrement au moyen de sondes thermiques (Harvard Apparatus, Paris, France). Les mesures de température, de concentration maximale en CO_2 ($EtCO_2$) dans l'air expiré et de saturation périphérique en

oxygène (SpO₂) ont été relevées tout au long du protocole.

4.2 Paramètres biochimiques sanguins

La gazométrie (pressions partielles sanguines en O₂ et CO₂ [PaO₂ et PaCO₂]), le pH sanguin, la glycémie, la créatininémie et la lactatémie, ont été évalués à partir de prélèvements sanguins artériels grâce à un automate (Epoc blood analysis, Epocal, Inc.®), Ottawa, Canada). Des prélèvements sanguins ont également été effectués afin de mesurer les concentrations plasmatiques en protéine S100B (PS100B) à l'état initial, à la fin de la procédure d'EAI puis au moment de l'euthanasie (Kit ELISA, Cloud-Clone corp, Katy, TX, Etats-Unis).

4.3 Survie et fonction neurologique

La survie des animaux a été évaluée pendant les 7 jours suivant l'hypoxie-ischémie. La dysfonction neurologique a été objectivée quotidiennement chez les survivants à partir d'une grille de récupération neurologique préalablement validée chez le porcelet [288]. Le Tableau 3 montre les critères évalués cliniquement. Cette grille permettait d'attribuer à chaque animal une notation allant de 0 point (absence de dysfonction) à 154 points (mort cérébrale). Afin de faciliter la lecture des résultats, ce score était ensuite ramené sur une échelle de 0 à 100 par une opération linéaire. En accord avec notre comité d'éthique, les animaux qui présentaient un score de dysfonction de plus de 50, au-delà de 48 h après l'hypoxie-ischémie ont été euthanasiés. Il en était de même pour les animaux présentant des crises convulsives récurrentes dès 24 h après la procédure. Un score maximal était également attribué lorsque les animaux mourraient avant leur évaluation neurologique quotidienne. À la fin des 7 jours de suivi, les survivants ont été euthanasiés.

Signes évalués	Note
Niveau de conscience	0 normal ; 5 léthargique ; 10 stupeur ; 15 coma
Fonction du tronc cérébral	
Respiration	0 normal ; 5 présent mais anormal ; 10 absent
Réflexe pupillaire	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Réflexe cornéen	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Réflexe nauséux	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Réponse sensorielle	
Olfaction	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Réponse à la menace/orientation	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Audition	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Réflexe de retrait	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Proprioception	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Fonction motrice	
Tonus musculaire du tronc	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 flaccide
Tonus musculaire des membres	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 flaccide
Réflexes posturaux	
<i>Réponse à la poussée</i>	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
<i>Brouette</i>	0 normal ; 2 présent mais anormal ; 4 absent
Mobilité	0 normal ; 5 ataxie mais marche sans tomber ; 10 ataxie et marche et tombe fréquemment ; 15 ne peut pas marcher mais tient sans assistance ; 20 ne tient pas debout sans assistance ; 25 ne tient pas debout mais maintient tête et tronc ; 30 ne peut pas faire de mouvements volontaires
Orientation spatiale	
Pendant la locomotion	0 normal ; 4 anormal ; 8 absent
Avec reniflement	0 normal ; 2 anormal ; 8 absent
Avec exploration	0 normal ; 4 absent
Activité	
Appétit	0 normal ; 2 anormal ; 4 absent
Vocalisation	0 normal ; 2 anormal ; 4 absent
Activité psychomotrice	0 normal ; 2 anormal ; 4 absent
Interaction sociale	0 normal ; 2 anormal ; 4 absent
Crise convulsive	0 absence ; 15 présence
Total	154 (score maximal)

Table 3: Grille utilisée pour évaluer la fonction neurologique chez le porcelet, adapté d'après Agnew *et al.* [288]

C. Modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez le lapin

Ce modèle a été utilisé pour étudier la réponse inflammatoire lors du syndrome post-arrêt cardiaque, ainsi que sa modulation par l'hypothermie ou par un agent pharmacologique. Cela a correspondu à deux études successives dans lesquelles nous avons évalué à la fois la récupération neurologique des animaux et la réponse immune et inflammatoire systémique. Le modèle expérimental d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire avait été préalablement développé par le laboratoire et avait apporté la preuve de sa pertinence à l'occasion de publications antérieures [10, 8].

1 Préparation chirurgicale

Une fois les animaux anesthésiés et placés sous ventilation mécanique, ils ont été instrumentés à l'aide d'un cathéter dans l'artère médiale de l'oreille et de deux voies veineuses auriculaires. Deux électrodes thoraciques ont ensuite été introduites dans l'œsophage et entre les plans musculaires intercostaux, en regard du 4^{ème} espace intercostal, pour l'induction ultérieure de la fibrillation ventriculaire. Les deux électrodes étaient ensuite retirées avant la RCP, afin de ne pas gêner la réalisation du massage cardiaque externe.

2 Arrêt cardiaque et réanimation

Après l'instrumentation chirurgicale, la fibrillation ventriculaire a été induite par l'application d'un courant électrique (10 V et 4 mA) entre les deux électrodes thoraciques. La ventilation mécanique était interrompue simultanément. Le courant électrique était maintenu pendant 2 min afin de prévenir le risque de conversion électrique spontanée, puis stoppé après vérification de l'arythmie à l'ECG. La durée totale de la période de fibrillation ventriculaire était fixée à 10 min. À la suite de cette période, les animaux ont été réanimés au moyen de compressions thoraciques externes (200 compressions/min) et d'administration d'adrénaline (20 µg/kg i.v.). Des chocs électriques de défibrillation (10J/Kg) ont été administrés à partir de la 2^{ème} minute de RCP et répétées toutes les minutes, en alternance avec des administrations d'adrénaline, jusqu'à l'obtention d'une RACS.

La RACS était définie comme le maintien d'une pression artérielle moyenne spontanée supérieure à 40 mmHg pendant une durée supérieure à 1 min. Les animaux ayant présenté une RACS au cours des 10 premières minutes de massage cardiaque étaient considérés comme réanimés. L'absence de RACS au cours de cette période ou le développement d'hémorragie pulmonaire étaient considérés comme un échec de réanimation. Une administration continue d'adrénaline était permise pendant les 6 premières heures suivant la RACS de façon à maintenir une PAM supérieure à 70 mmHg. Le sevrage de la ventilation mécanique et le réveil des animaux étaient réalisés à l'issue de ces 6 heures.

3 Paramètres mesurés

3.1 Pression artérielle, électrocardiogramme et température

Au cours du protocole expérimental, l'ECG, la pression artérielle systémique mesurée au moyen du cathéter implanté dans l'artère auriculaire, et la pression respiratoire ont été enregistrés en continu à l'aide du logiciel HEM 3.5 (Notocord Systems, Croissy-sur-Seine, France). La fréquence cardiaque et la PAM ont ensuite été calculée à partir de ces signaux. Les températures rectales et œsophagiennes, l'EtCO₂ et la SpO₂ ont également été monitorées.

3.2 Paramètres biochimiques sanguins

Le pH sanguin, la gazométrie artérielle, la créatininémie et la lactatémie ont été évalués à l'aide du même automate que celui présenté précédemment (Epoc Reader, Epocal Inc. Ottawa, Canada).

3.3 Suivi et fonction neurologique

La récupération neurologique des animaux ayant survécu a été évaluée durant les 3 jours suivant l'arrêt cardiaque. Pour cela, des examens cliniques quotidiens ont été réalisés afin d'évaluer la dysfonction neurologique, sur la base des réflexes, des réactions posturales et du comportement des animaux. Un score de dysfonction a ainsi été attribué selon une grille préalablement validée dans la littérature (déficit neurologique de 0-10% = normal ; 100% = mort cérébrale; Table 4). Lorsqu'un animal présentait un score de dysfonction neurologique supérieur à 80% au lendemain de la procédure ou qu'une dysfonction de plus de 60% persistait pendant plus de 48 h après l'arrêt cardiaque, il était euthanasié pour raison éthique. Au terme des 3 jours de suivi, les animaux survivant ont été euthanasiés et leurs organes prélevés pour la réalisation d'analyses histologiques.

4 Évaluation de la perméabilité de la BHE

Des animaux supplémentaires ont été soumis au même protocole de fibrillation ventriculaire mais n'ont pas été réveillés afin de pouvoir procéder à des analyses complémentaires en condition aiguë. Afin d'évaluer l'intégrité de la BHE, certains animaux ont reçu une administration de 4ml/kg de bleu Evans à 4% (i.v. ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) 30 min après l'arrêt cardiaque. En condition physiologique, la BHE est en effet imperméable à ce colorant. Les animaux ont ensuite été maintenus pendant 2 h sous ventilation mécanique pour permettre la distribution tissulaire du colorant, puis euthanasiés. Le volume sanguin cérébral résiduel a été lavé par l'administration de 250 ml de NaCl 0,9% dans les deux carotides. Le cerveau a ensuite été prélevé et le cortex, le tronc cérébral et le cervelet homogénéisés et incubés dans une solution de formamide pur (Sigma-Aldrich, 1ml pour 100g de tissu) pendant 48 h à 37°C. Après centrifugation, une mesure d'absorbance à 620 nm a été réalisée sur le surnageant. La concentration de Bleu Evans a été calculée à

Signes évalués	Note	
Niveau de conscience	25	
Normal		0
Prostré		5
Stupeur		10
Comateux		25
Respiration	5	
Normale		0
Anormale		5
Nerfs crâniens	7	
Absence de la vue		1
Absence du réflexe photomoteur droit		0,5
Absence du réflexe photomoteur gauche		0,5
Absence du réflexe oculo-céphalique		1
Absence du réflexe cornéen droit		0,5
Absence du réflexe cornéen gauche		0,5
Absence de sensations faciales		1
Absence de l'ouïe		1
Absence du réflexe de déglutition		1
Fonction motrice et sensorielle	14	
Absence de la sensation de douleur aux antérieurs		2
Absence de la sensation de douleur aux postérieurs		2
Absence du réflexe de redressement aux antérieurs		5
Absence du réflexe de redressement aux postérieurs		5
Allure de la démarche	25	
Normale		0
Ataxie minimale		5
Ataxie modérée		8
Ataxie sévère		12
Redressement en position sternale		15
Ne peut pas se lever		20
Pas de mouvements utiles		25
Comportement	24	
Ne fait pas sa toilette		4
Ne boit pas		10
Exploration limitée		5
Pas de comportement exploratoire		10
Total	/ 100 (score maximal)	

Table 4: Grille utilisée pour évaluer la fonction neurologique chez le lapin, d'après Kohlhauer et *al.* [10]

l'aide d'une courbe de calibration et le résultat exprimé en microgrammes de Bleu Evans par gramme de tissus.

D. Analyse de la réponse inflammatoire chez le lapin

1 Dosages des médiateurs inflammatoires plasmatiques

En fonction du protocole expérimental, des échantillons de sang ont été régulièrement collectés au cours du suivi des animaux après l'arrêt cardiaque afin d'évaluer la concentration plasmatique de diverses cytokines et marqueurs de dommages tissulaires. Les concentrations en IL-1 β (R&D Systems, Minneapolis, USA), IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, USA), TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, USA), IL-10 (Elabscience, Houston, USA), HMGB1 (Abnova, Milton, United-Kingdom), PS100B (FineTest, Wuhan, China) ont été déterminées par méthode ELISA avec des kits spécifiques.

2 Cytométrie en flux sur sang total

D'autres échantillons de sang ont été collectés au cours du suivi des animaux afin d'effectuer un dénombrement des populations leucocytaires sanguines par méthode de cytométrie en flux. Pour cela, à chaque temps étudié, le sang était collecté sur tube EDTA puis réparti dans des tubes secs, à raison de 100 μ L par tube. Immédiatement après leur collecte, les échantillons ont été incubés pendant 15 min dans 2 ml d'une solution de lyse des globules rouges (RBC Lysing Buffer, TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France), puis fixés dans une solution de paraformaldéhyde à 0,5% afin de pouvoir être conservés en vue d'un marquage le lendemain. Préalablement à la réalisation des marquages, les cellules ont été incubées pendant 5 min avec 2 μ L de protéine Fc recombinante (Fc block, BD Biosciences, San José, CA, États-Unis) afin de limiter la fixation non spécifique des immunoglobulines aux récepteurs Fc présents à la surface de nombreuses cellules immunitaires, telles que les lymphocytes B ou les macrophages. Les différentes populations de leucocytes ont été marquées à l'aide des anticorps primaires monoclonaux suivants : anti-lymphocyte conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 647 (KEN5, 5 μ L, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, États-Unis), anti-CD4 conjugué à de la phycoerythrine (PE) (0,75 μ L, Lifespan Biosciences, Seattle, États-Unis), anti-CD8 conjugué à de la fluorescéine isothiocyanate (FITC) (5 μ L, Lifespan Biosciences, Seattle, États-Unis), anti-CD11b conjugué à de l'allophycocyanine (APC) (clone M1/70, 1 μ L, EXBIO praha, Vestec, Tchécoslovaquie), anti-CD14 conjugué à du FITC (5 μ L, Clone TÛ, 5 μ L, Lifespan Biosciences, Seattle, États-Unis), et anti-CD79a conjugué à de l'APC (clone HM57, 5 μ L, EXBIO praha, Vestec, Tchécoslovaquie). Pour le marquage des antigènes de surface, les cellules étaient incubées pendant 30 min avec les anticorps correspondant, à température ambiante. Elles étaient ensuite lavées trois fois avec une solution de BSA à 0,5%, puis remise en suspension dans 200 μ L de *staining Buffer* (ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Pour le marquage de CD79a, le seul antigène intracellulaire étudié, nous avons préalablement utilisé un kit de perméabilisation disponible dans le commerce (Fix & Perm cell permeabilization kit®, ThermoFisher, Waltham, Massachusetts, USA), avant de procéder à l'incubation avec l'anticorps. Les analyses ont été conduites à l'aide d'un cytomètre AccuriC6 4 couleurs (BD Biosciences, San José, CA, États-Unis).

3 Cytométrie en flux sur tissu cérébral

Des animaux supplémentaires ont également été utilisés afin d'évaluer l'infiltration du cerveau par les cellules immunitaires périphériques. Pour cela, les animaux ont été euthanasiés à différents temps après l'arrêt cardiaque (2 ou 6 h après la RACS) puis perfusés avec du PBS froid (Depulcco, REF) dans les deux carotides afin d'éliminer le sang présent dans la circulation cérébrale (200 ml par carotide). Un hémisphère cérébral a alors été préparé pour la réalisation d'une cytométrie en flux, selon le protocole décrit par Möller *et al* [289]. L'hémisphère a tout d'abord été soumis à une première étape de dissociation mécanique (dissection au scalpel), puis incubé 45 min à 37°C dans un tampon de digestion enzymatique (collagénase I-A à 1mg/ml et DNase I à 100 U/ml), avec une agitation constante. La suspension résultante a été filtrée sur un tamis de 40 μm et lavée avec une solution de HBSS (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis) contenant 3% de fetal bovine serum (FBS, REF) et de la DNase I (100 U/ml ; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, États-Unis). La microglie et les leucocytes ont été isolées par centrifugation de la suspension dans un gradient de densités, réalisé à l'aide de solutions de Percoll à 21, 38 et 80%, respectivement. Le gradient était centrifugé pendant 40 min à température ambiante, puis l'interphase III contenant les populations d'intérêt (Figure 36) était collectée. Le culot cellulaire était ensuite lavé à deux reprises avec une solution de FBS à 3%. On procédait ensuite au marquage des antigènes de surface. Pour cela, le culot cellulaire a été réparti dans des tubes secs et les cellules étaient incubées pendant 30 min à 4°C avec les anticorps monoclonaux de marquage. Les leucocytes et la microglie ont tout d'abord été séparés des débris et autres types cellulaires grâce à un anticorps anti-CD45 conjugué FITC (clone MEM-55, 10 μL , Lifespan Biosciences, Seattle, États-Unis). Les lymphocytes ont ensuite été identifiés grâce à un anticorps anti-lymphocytes conjugué au fluorochrome Alexa Fluor 647 (KEN5, 5 μL , Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, États-Unis), puis répartis en CD4+ et CD8+ grâce à des anticorps anti-CD4 conjugués PE (0,75 μL , Lifespan Biosciences, Seattle, États-Unis) et anti-CD8 conjugués PE (1 μL , REF) tandis que la microglie, les granulocytes et les monocytes ont été marqués grâce à un anticorps anti-CD11b conjugué APC (clone M1/70, 1 μL , EXBIO praha, Vestec, Tchécoslovaquie).

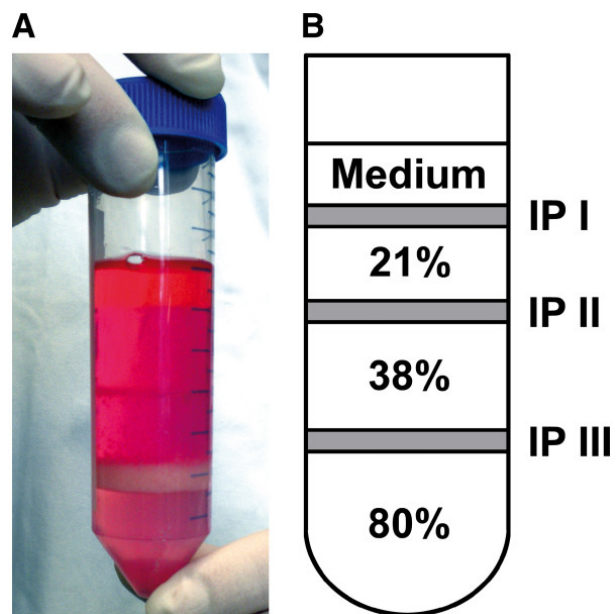


Figure 36: Présentation du gradient de densité utilisé pour l'isolement des cellules immunitaires cérébrales (A) et composition du gradient après centrifugation (B), d'après [289].

IP, interphase

E. Procédure de ventilation liquide totale

Les deux premières études présentées dans ce mémoire, ont nécessité la mise en œuvre d'une VLT. Elles ont en effet eu pour objectif d'investiguer l'efficacité neuroprotectrice d'une hypothermie ultra-rapide induite par cette méthode ainsi que les mécanismes sous-tendant cette protection.

La VLT a été réalisée à l'aide du prototype Inolivent 5.0, chez des animaux préalablement anesthésiés, intubés et curarisés. Le poumon était alors rempli avec un premier volume de 10 ml/kg de perfluorocarbones, administrés par voie intra-trachéale sur une période de 5 s. En fonction des travaux, les perfluorocarbones utilisés étaient le Perflubron® (Exflur, Round Rock, TX, USA) ou le perfluoro-octane (PFO ; F2 Chemical Ltd., Manchester, UK). La ventilation liquidienne était débutée avec un volume courant de 10 ml/kg et à une fréquence de 8-9 respirations par minutes pendant une durée de 20 à 30 min en fonction de l'étude, de manière à atteindre la température cible de 32-33°C le plus rapidement possible. AU début de la VLT, le volume instillé de PFC dépendait des conditions expérimentales. Il correspondait au volume de liquide en fin d'expiration, qui était maintenu à la valeur souhaitée tout au long de la VLT. La température du perfluorocarbone était initialement fixée à 20°C pour obtenir un refroidissement rapide puis progressivement réchauffée au cours de la ventilation. À la fin de la procédure, les poumons étaient vidés par une expiration prolongée de 30 s à la pression de -10 cmH₂O et la sonde endotrachéale était reconnectée au ventilateur gazeux.

F. Analyses histologiques post-mortem

Dans toutes les études, les séquelles neurologiques éventuelles de l'arrêt cardiaque ont également été évaluées grâce à des analyses histologiques. Après euthanasie, les animaux ont été perfusés par voie carotidienne avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% (200ml par carotide). Les cerveaux ont été prélevés et fixés au PFA 4% pendant une semaine. Les prélèvements ont ensuite été inclus en paraffine, coupés en tranches de 5 μm et colorés par un mélange d'hématoxyline-éosine-safran ainsi que par du Fluorochrome C, un dérivé de la fluorescéine marquant les neurones dégénérés. Les neurones marqués au Fluorochrome C ont été dénombrés dans plusieurs régions d'intérêt (le cortex, l'hippocampe voire le striatum en fonction des études). Dans chaque région, les comptages ont été effectués sur 5 champs d'une surface de 0,150 mm^2 . Un marquage immunohistochimique des leucocytes circulants a également été réalisé sur le tissu cérébral afin d'apprécier leur migration intra-tissulaire et la neuro-inflammation. Pour cela, nous avons utilisé un anticorps monoclonal reconnaissant un antigène commun aux lymphocytes T et aux neutrophiles (RPN3/57, BioRad, Hercules, CA, USA), dilué au 1:100.

G. Analyses statistiques

Dans toutes les études, les valeurs ont été exprimées en moyenne \pm SEM (*standard error of the mean*). Les paramètres hémodynamiques, températures, paramètres biochimiques et inflammatoires (variables continues) ont été comparés entre les différents groupes par une analyse de la variance par mesure répétées (ANOVA). Si nécessaire, cela était suivi par un test de Student avec correction de Bonferonni ou d'un test post-hoc de Holm-Sidak en fonction des études. Pour limiter le nombre de comparaisons, seules les valeurs des paramètres entre les groupes ont été comparées, et non entre les différents temps expérimentaux. La dysfonction neurologique et les paramètres histologiques (dénombrement de neurones dégénérés) ont été comparés entre les groupes par un test non paramétrique de Kruskal-Wallis, suivi par une analyse post-hoc de Mann-Whitney. Les courbes de survie ont été obtenues par une analyse de Kaplan-Meier et ont été comparées entre les groupes par un test de Logrank. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

Chapitre 2

Résultats

A. Évaluation des effets neuroprotecteurs d'une VLT hypothermisante au décours de l'encéphalopathie anoxo-ischémique néonatale

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

A New Paradigm for Lung-Conservative Total Liquid Ventilation.

Kohlhauer M.*, **Boissady E.***, Lidouren F., de Rochefort L., Nadeau M., Rambaud J., Hutin A., Dubuisson RM., Guillot G., Pey P., Bruneval P., Fortin-Pellerin E., Sage M., Walti H., Cariou A., Ricard JD., Berdeaux A., Mongardon N., Ghaleh B., Micheau P., Tissier R. **Ebiomedicine**. 2019 ; 52.

* *Contribution identique*

1 Introduction

Comme cela l'a été explicité au cours de la synthèse bibliographique, la VLT constitue une stratégie innovante efficace pour induire une hypothermie généralisée de façon ultra-rapide. Dans la mesure où son efficacité est indépendante de la masse de l'organisme ventilé, elle offre des perspectives intéressantes en vue d'accélérer le refroidissement chez l'homme après un arrêt cardiaque. Cela est d'autant plus vrai que des études antérieures du laboratoire ont déjà fait la preuve de concept des bénéfices neuroprotecteur d'une VLT hypothermisante au décours d'un arrêt cardiaque chez le lapin [10, 8, 9]. Cependant, les précédentes applications cliniques de la ventilation liquidienne ont montré que ce type de procédure, lorsqu'elle était réalisée sans matériel adéquat pour assurer un contrôle rigoureux des volumes et pressions dans les voies aériennes, pouvait se révéler délétère. Par exemple, dans le seul essai clinique conduit sur la VLT, qui s'est intéressé à ses effets chez les nouveau-nés souffrant de détresse respiratoire, les poumons étaient remplis par gravité, sans ventilateur dédié [208]. Les quelques patients inclus dans l'étude ont rapidement présenté

des signes de barotraumas induit par la ventilation, qui ont majoré l'atteinte préexistante et aggravé le pronostic final. Depuis ces premiers essais, des avancées technologiques ont été faites avec la mise au point d'un prototype de ventilateur liquidien capable de réguler finement le profil expiratoire ainsi que les volumes et pressions de remplissage pulmonaire. Néanmoins des recommandations précises concernant les paramètres ventilatoires optimaux, qui permettraient de sécuriser et de standardiser la procédure chez l'homme, manquent encore. Le but de cette étude était donc d'évaluer la tolérance pulmonaire, à court et long terme, de différentes modalités de VLT dans des conditions pertinentes d'un point de vue clinique. Les paramètres ventilatoires offrant la meilleure tolérance, déterminés chez des porcelets, ont ensuite été appliqués chez des porcs adultes et des primates non-humain afin de confirmer la faisabilité de la procédure chez l'homme. Ma contribution dans cette étude a essentiellement consisté à confirmer que notre approche de ventilation protectrice était applicable dans un modèle physiopathologique d'hypoxie-ischémie, et qu'elle conservait sa capacité à induire un refroidissement ultra-rapide ainsi que ses bénéfices neuroprotecteurs après un arrêt cardiaque. Je ne détaillerai donc que les résultats correspondants à cette partie de l'étude. Avant cela nous résumerons les autres travaux de cette publication pour rappeler le contexte de l'étude.

Brièvement, les autres travaux ont comparé la tolérance de la VLT avec quatre combinaisons de volume de fin d'expiration (VE ; 15 ou 30 ml/kg) et de volumes courant (VT ; 8 ou 16 ml/kg) chez des porcelets (n=5 dans chacun des groupes VT8-VE15, VT16-VE15, VT8-VE30 et VT16-VE30). Les valeurs de volume résiduel ont été choisies de manière à ventiler les animaux autour de leur CRF, estimée grâce à des expériences préliminaires de tomographie sous ventilation gazeuse conventionnelle. L'objectif était également de comparer l'effet d'une ventilation avec un volume courant proche de ceux jusqu'alors utilisés dans la littérature expérimentale (16 ml/kg) à une ventilation avec un volume bien plus faible, supposé mieux toléré (8 ml/kg). La fréquence respiratoire avait quant à elle été fixée de manière à maintenir un volume minute similaire entre les différents groupes (*i.e.*, 9 vs 4,5 cycles dans les groupes avec un VT de 8 vs 16 ml/kg).

Parmi les principaux résultats obtenus au cours de cette première série d'expérimentations, les échanges gazeux au cours de la VLT étaient corrects dans tous les groupes expérimentaux. Les valeurs de PaO₂ et de pH mesurées au cours de la VLT dans les différents groupes étaient en effet similaires à celles d'animaux maintenus sous ventilation gazeuse. Seule une augmentation significative de la PaCO₂ a été observée dans les groupes VT8-VE15 et VT16-VE15. Cette altération de l'extraction du CO₂ pouvait toutefois s'expliquer par le choix de ventiler avec une fréquence respiratoire fixe (non adaptative).

Les porcelets du groupe « hauts volumes » (VT16-VE30) ont tous développés des troubles respiratoire modérée à sévère consécutivement à la VLT. Après leur réveil, certains animaux de ce groupe ont en effet rapidement montré des signes de détresse respiratoire aiguë et ont dû être euthanasiés prématurément. Les autres ont présenté une dyspnée/polypnée persistante. Les animaux des autres groupes n'ont en revanche présenté aucune anomalie respiratoire. L'atteinte clinique dans le groupe « hauts volumes » était associée à des lésions pulmonaires étendues (œdème et hémorragies pulmonaires), mises en évidence par IRM. Le

protocole d'IRM avait d'ailleurs été adapté de manière à mesurer de façon concomitante les quantités de PFC résiduels dans les poumons. Nous avons ainsi montré que l'atteinte pulmonaire identifiée dans le groupe « hauts volumes » s'accompagnait d'une plus grande persistance des PFC dans les poumons par rapport aux groupes ventilés avec des volumes inférieurs. La ventilation des animaux avec des volumes de PFC relativement faibles était donc non seulement faisable mais présentait une meilleure innocuité à court terme. Des expériences ont également été menées afin de mieux comprendre la répartition des PFC au cours de la VLT et la mécanique ventilatoire aux différents niveaux de remplissage étudiés. Pour cela une tomographie a été réalisée au cours de la ventilation liquidienne chez quelques porcelets. La VLT était tout d'abord appliquée avec les paramètres « bas volumes » (TV8-EV15) pendant 15 min, puis les paramètres étaient successivement modifiés pour correspondre aux autres conditions étudiés, et maintenus à chaque fois pendant 10 min (VT16-VE15, VT8-VE30 et VT16-VE30). Cette expérience a permis de confirmer que le remplissage des poumons était incomplet dans les groupes ventilés à bas volume, contrairement au groupe VT16-VE30. Plus particulièrement, dans les groupes à VE = 15 ml/kg les lobes pulmonaires les plus crâniens ne contenaient aucun PFC, alors qu'un remplissage partiel était objectivé dans les autres groupes. Les lobes caudaux et moyens étaient en revanche totalement remplis, indépendamment des volumes utilisés. Ces résultats suggèrent que la région pulmonaire crâniale agit comme une zone tampon, en absorbant les volumes de PFC additionnels.

Il est ainsi apparu que, contrairement au dogme selon lequel les poumons devaient être entièrement remplis de PFC afin de d'assurer un recrutement maximal des alvéoles [290, 202], le remplissage incomplet des poumons, avec des volumes inférieurs à la CRF, permettait de maintenir des échanges gazeux aussi efficaces tout en étant mieux tolérés. Il semble en effet que le volume pulmonaire résiduel dans la seconde configuration, agisse comme une réserve de recrutement alvéolaire, prévenant la distension excessive des alvéoles par les liquides. C'est donc cette stratégie de VLT que nous avons appliquée en vue d'induire une hypothermie ultra-rapide au décours d'un arrêt cardiaque pédiatrique chez le porcelet.

2 Protocole expérimental

Comme l'illustre la Figure 37, les animaux ont été répartis en 3 groupes expérimentaux. Les animaux du groupe « Sham » ont été anesthésiés, ventilés et suivis sans aucun épisode d'hypoxie. Dans les deux autres groupes, les animaux ont été soumis à une procédure d'hypoxie-ischémie selon les modalités décrites précédemment. Ils ont ensuite fait l'objet d'une RCP par massage cardiaque externe et administration d'adrénaline. Immédiatement après la réanimation, ils ont été répartis de façon aléatoire entre un groupe Témoin et un groupe VLT. Le groupe Témoin n'a fait l'objet d'aucune procédure particulière en sus de celles décrites précédemment et les animaux ont été maintenus à une température cible de 38-39°C durant les 6 h suivant l'épisode d'hypoxie. Le groupe VLT a fait l'objet d'une hypothermie instaurée par VLT à partir de la 5^{ème} min suivant la RACS. Au bout de 30 min, la VLT était stoppée et les animaux retransférés sur le respirateur gazeux. Une fois atteinte, la température rectale cible de 33°C était maintenue durant 3 h après la RACS

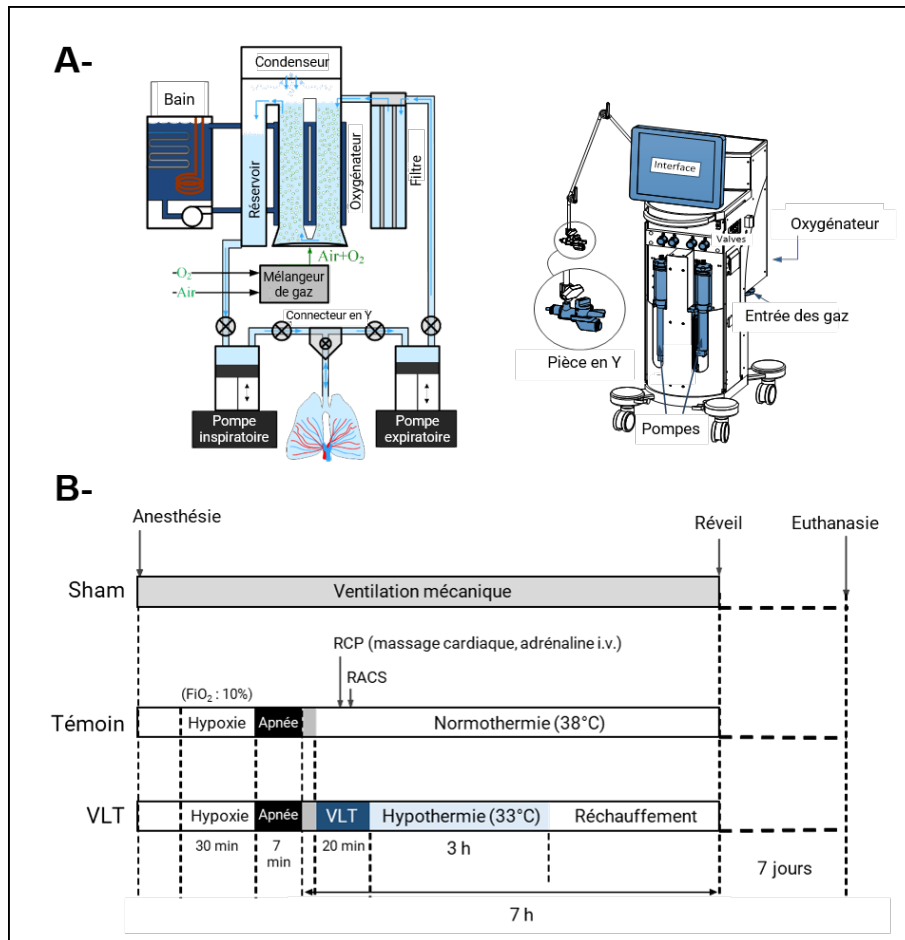


Figure 37: Présentation du prototype de ventilation liquidienne (A) et du protocole expérimental (B).

RACS, reprise d'une activité circulatoire spontanée ; RCP, réanimation cardiopulmonaire ; VLT, ventilation liquide totale

à l'aide de couvertures froides, si nécessaire. À partir de la 3^{ème} heure post-asphyxie, les animaux ont été réchauffés à la vitesse d'1°C/heure, à l'aide de tapis chauffants et de lampes à infrarouge. Une fois sevrés de la ventilation artificielle, les animaux ont été placés dans une cage hermétique dont l'air était enrichi en oxygène pendant 24 h. Les survivants ont fait l'objet de soins réguliers pendant 7 jours (fluidothérapie, nutrition, antalgie, antibiothérapie) comme décrit précédemment. Au terme de cette période, ils ont été euthanasiés et les organes étaient prélevés pour des analyses anatomopathologiques ultérieures.

Le critère principal de l'étude était la survie des animaux. Le score de dysfonction neurologique ainsi que les lésions histologiques constituaient des critères secondaires.

3 Résultats

Huit animaux ont été réanimés avec succès et inclus dans chacun des groupes Témoin et VLT. Quatre animaux ont été inclus dans le groupe Sham. Comme illustré par la figure 38, les températures étaient identiques dans les différents groupes avant la RCP. Dans le groupe VLT les températures œsophagienne et rectale ont été abaissées à 33°C en respectivement

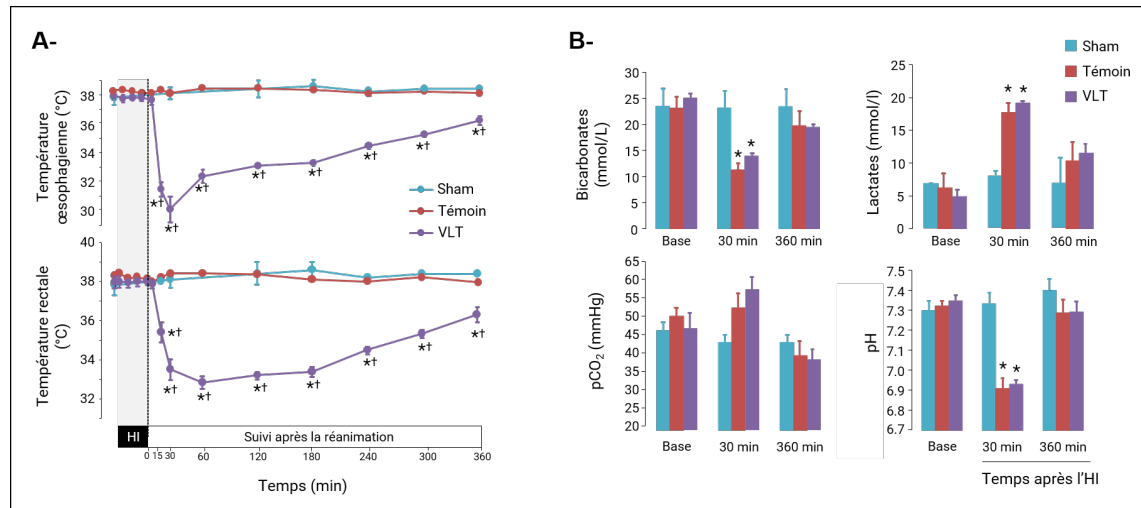


Figure 38: Évolution des températures rectale et oesophagienne (A), paramètres acido-basiques et gazométrie (B) dans chacun des groupes au cours de la procédure. HI, Hypoxie-ischémie; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

10 et 20 min après le début de la VLT hypothermisante, ce qui est comparable aux vitesses de refroidissement rapportées dans des études antérieures [8, 9, 10]. Trente minutes après la RCP, les porcelets des groupes Témoin et VLT présentaient une baisse significative du pH et de la bicarbonatémie, ainsi qu'une élévation de la lactatémie par rapport au groupe Sham. Par ailleurs, les échanges gazeux n'étaient pas différents dans les groupes Témoin et VLT, comme en témoigne les valeurs de pH et de pCO₂ (Figure 38).

Suite à la procédure d'hypoxie-ischémie, les animaux du groupe Témoin ont présenté des troubles neurologiques sévères au cours des 7 jours de suivi à l'état éveillé. Un animal est mort spontanément avant la première évaluation neurologique le lendemain de l'hypoxie-ischémie. Les 7 autres ont été euthanasiés avant la fin du protocole pour raison éthique, du fait de la gravité de leur état neurologique (crises convulsives et paralysie cérébrale). Comme illustré par la Figure 3, les animaux du groupe VLT ont présenté une meilleure récupération neurologique. Seul 3 animaux ont dû être euthanasiés pour raison éthique et le score de dysfonction neurologique du groupe VLT était significativement inférieur à celui du groupe Témoin à partir du 2^{ème} jour suivant l'hypoxie-ischémie. La survie dans le groupe VLT était ainsi améliorée par rapport au groupe Témoin (respectivement 0% vs 50% dans les groupes Témoin et VLT). L'effet neuroprotecteur de la VLT était aussi suggéré par l'évolution des concentrations plasmatiques en PS100B. Elles étaient en effet augmentées dans le groupe Témoin au moment de l'euthanasie par rapport à la valeur initiale, mais pas dans les groupes VLT et Sham. Toutefois, la différence entre les groupes n'était pas significative.

Enfin, les bénéfices neuroprotecteurs de la VLT hypothermisante ont été corroborés par les résultats des analyses histologiques. Comme illustré par la Figure 41, les animaux du groupes VLT ont présenté une diminution du nombre de neurones positifs au FluoroJade C par rapport aux animaux du groupe Témoin, dans 3 des 4 régions étudiées (l'hippocampe,

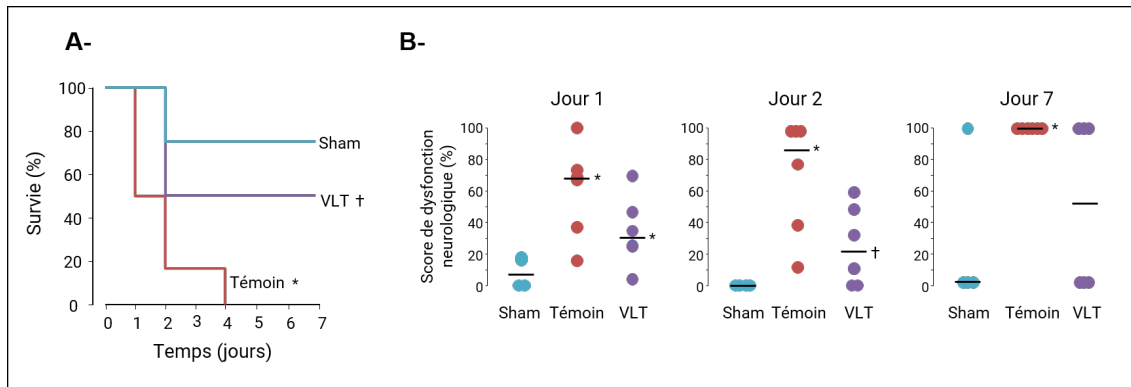


Figure 39: Courbe de survie de Kaplan-Meier dans les différents groupes expérimentaux (A) et scores de dysfonction neurologique à l'issue de l'hypoxie-ischémie ou de la procédure Sham (B ; 0% = absence de dysfonction ; 100% = mort). Les cercles et les traits pleins représentent les scores individuels et les médianes des scores dans chaque groupe, respectivement.
 *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham ; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

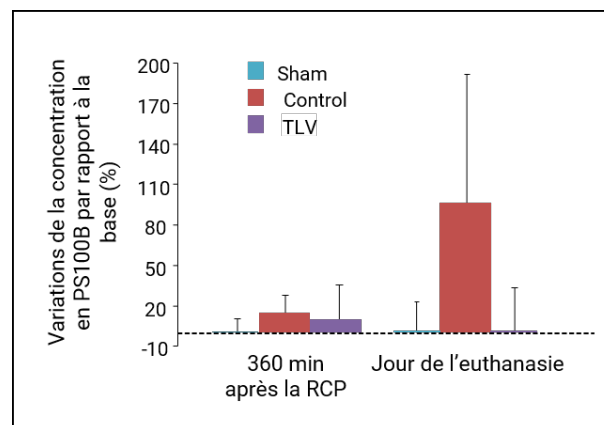


Figure 40: Évolution des concentrations sanguines en PS100B au décours de l'hypoxie-ischémie.
 RCP, réanimation cardio-pulmonaire

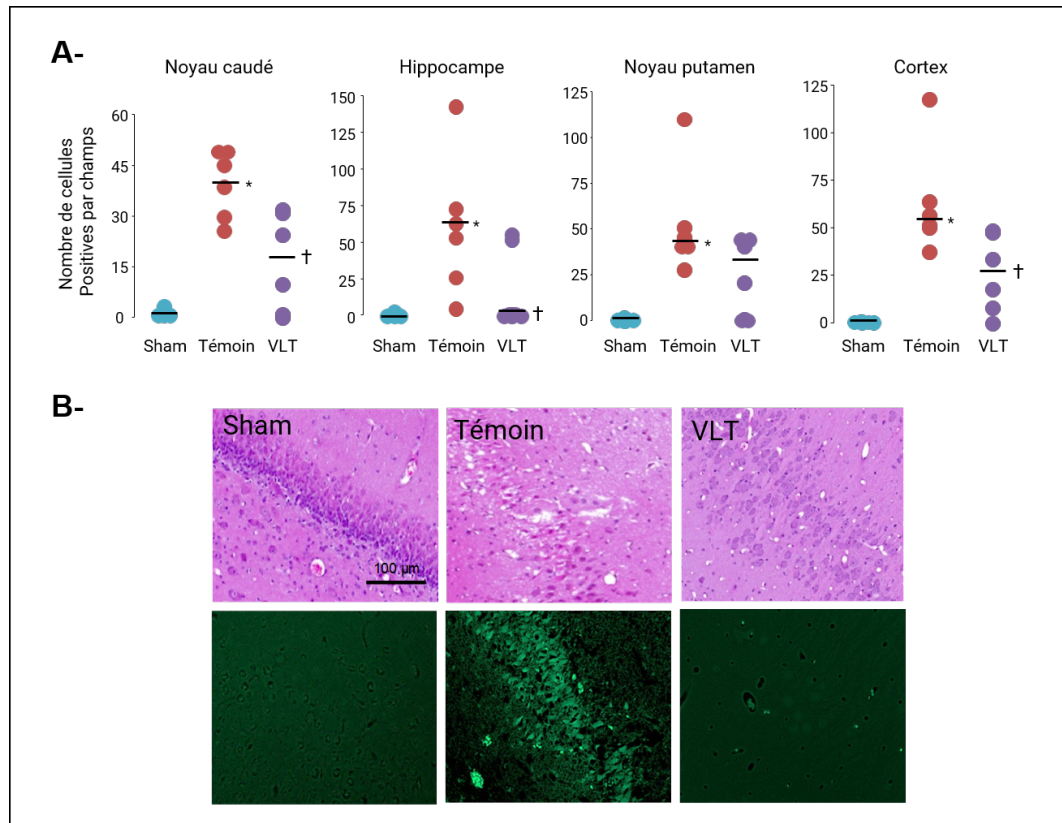


Figure 41: Comptages des neurones marqués au Fluorochrome C, exprimés en nombre moyen par champs analysé (par animal), dans chacune des régions d'intérêt du cerveau (A). Les cercles représentent les valeurs individuelles de chaque animal. Aspect histologique d'une zone représentative de l'hippocampe coloré à l'Hématoxyline-éosine (ligne supérieure) et au fluorochrome C (ligne inférieure) dans les différents groupes expérimentaux (B).
 *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

le cortex et le noyau caudé), réputées pour leur sensibilité aux lésions d'hypoxie.

4 Commentaires

Dans cette étude, nous avons montré que le potentiel neuroprotecteur de l'hypothermie ultra-rapide induite par VLT au décours d'une ischémie-reperfusion généralisée était conservé lorsque la VLT était réalisée selon un nouveau paradigme de ventilation protectrice à bas volumes.

Cette stratégie de ventilation conservait, malgré la diminution des volumes de PFC utilisés, un potentiel d'extraction de chaleur très intéressant. La vitesse de refroidissement obtenue sur les porcelets de cette étude était similaire à celle de travaux antérieurs sur des lapins de poids similaire, aussi bien en région thoracique que dans les autres compartiments de l'organisme. En particulier, la température des viscères abdominaux, approximée par la température rectale, était abaissée à 33°C en moins de 20 min, ce qui correspond à une vitesse de refroidissement d'environ 10-15°C/h. A titre de comparaison, dans l'étude princeps de Forman et *al.*, les agneaux étaient refroidis à la vitesse de 8,4°C/h [215]. Dans

cette étude les PFC était initialement placés à 20°C et les animaux étaient ventilés avec un volume courant de $14,9 \pm 3,3$ ml/kg et une fréquence respiratoire de 4-5 cycles/min. *In fine*, la vitesse de refroidissement du refroidissement induit par notre stratégie reste donc bien supérieure à celles de la majorité des autres techniques hypothermisantes disponibles en clinique, qui, même chez l'enfant, nécessitent plusieurs heures pour atteindre la température cible [291, 292].

Un autre résultat intéressant de cette étude réside dans l'observation que notre approche de ventilation protectrice permettait de maintenir des échanges gazeux adéquats, même en conditions physiopathologiques. L'ischémie-reperfusion généralisée peut en effet être à l'origine de dommages alvéolaires diffus qui fragilisent le parenchyme pulmonaire et compromettent la fonction ventilatoire. Or, dans notre modèle, l'utilisation d'une ventilation liquidienne avec de faibles volumes résiduels télé-expiratoires et de faibles volumes courants, permettait non seulement de maintenir une oxygénation et une décarboxylation efficaces, mais prévenait également l'induction d'une dysfonction respiratoire (*i.e.*, de complications barotraumatiques). Suite au sevrage de la ventilation, les animaux présentaient en effet une fonction respiratoire normale, similaire à celle des animaux du groupe Témoin.

Enfin, le refroidissement très rapide ainsi obtenu après la RCP était associé à une amélioration de la fonction neurologique des animaux. Le groupe VLT présentait en effet non seulement une meilleure récupération clinique mais aussi moins de lésions histologiques cérébrales, ce qui témoignait d'une préservation de l'intégrité des neurones. La neuroprotection préalablement objectivée dans le contexte de l'arrêt cardiaque de l'adulte était ainsi retrouvée dans la condition clinique un peu différente que représente l'arrêt cardiaque pédiatrique secondaire à une anoxo-ischémie néonatale. Dans ces travaux, l'hypothermie était induite très précocement après la reperfusion mais elle n'a ensuite été maintenue que pendant une courte période (pendant 3 h après la réanimation) en comparaison de ce qui est fait en pratique clinique (72 h en moyenne). Ainsi un bref épisode d'hypothermie induit rapidement après l'hypoxie semble suffisant pour induire des bénéfices neuroprotecteurs. Ces résultats suggèrent que l'induction suffisamment précoce de l'hypothermie à la suite d'un épisode ischémique suffirait à stopper le déclenchement d'une phase lésionnelle secondaire et permettrait de s'affranchir du prolongement de la durée d'hypothermie. À l'image de ce qui est suspecté dans l'arrêt cardiaque de l'adulte, il existerait donc une fenêtre thérapeutique relativement étroite au décours de l'anoxo-ischémie néonatale pour bénéficier du plein potentiel protecteur de l'hypothermie.

Néanmoins, notre modèle présente quelques limites. Notamment, pour des raisons pratiques de gestion des naissances et d'hébergement, les expériences ont été conduites sur des animaux âgés de plusieurs jours et non pas sur des porcelets nouveau-nés. Le modèle ne prenait donc pas en compte la transition cardio-vasculaire et respiratoire qui se produit au moment de la naissance, et il est possible qu'il ne reflète pas exactement la réponse à l'hypoxie du nourrisson [293].

Ces résultats ouvrent toutefois des perspectives encourageantes pour l'utilisation de la ventilation liquide chez les nouveau-nés victimes d'un arrêt cardiaque dans un contexte d'aspiration méconiale. Il s'agit en effet d'une cause fréquente de détresse respiratoire péri-

partum pouvant aboutir à un arrêt cardiaque. L'hypothermie ultra-rapide, combinée à l'effet de lavage pulmonaire de la VLT, permettrait probablement d'obtenir des bénéfices supérieurs à ceux des traitements actuellement utilisés en clinique, basés sur une hypothermie lente et des lavages broncho-alvéolaires à l'aide de solution saline. Des expériences ont en effet démontré que les PFC permettaient d'évacuer les débris méconiaux de façon plus efficace que les solutions salines, tout en améliorant la fonction respiratoire [294, 295]. Par ailleurs, dans ce corpus d'études, d'autres expériences ont montré que le principe de ventilation à bas-volumes, et l'efficacité de refroidissement associée, pouvait être transposé dans des modèles gros animaux, de taille similaire à un homme adulte.

En conclusion, cette étude montre qu'une ventilation liquidienne avec des volumes de PFC sous la CRF est non seulement bien tolérée mais que cela n'altère pas le potentiel thérapeutique de la procédure. L'étude propose ainsi un changement de paradigme pour la réalisation d'une VLT, en préconisant un remplissage partiel des poumons par les PFC, sous la CRF. Cette stratégie permettrait de maximiser le ratio bénéfice-risque de la VLT lors d'un arrêt cardiaque adulte ou pédiatrique.

Étude n°1

**A NEW PARADIGM FOR
LUNG-CONSERVATIVE TOTAL LIQUID
VENTILATION**

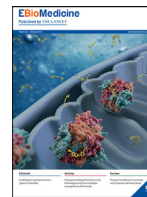
Matthias Kohlhauer*, **Émilie Boissady***, Fanny
Lidouren, Ludovic de Rochefort, Mathieu Nadeau, Jérôme
Rambaud, Alice Hutin, Rose-Marie Dubuisson, Geneviève
Guillot, Pascaline Pey, Patrick Bruneval, Étienne
Fortin-Pellerin, Michaël Sage, Hervé Walti, Alain Cariou,
Jean-Daniel Ricard, Alain Berdeaux, Nicolas Mongardon,
Bijan Ghaleh, Philippe Micheau, Renaud Tissier

Publié dans ***Ebiomedicine***



Contents lists available at ScienceDirect

EBioMedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ebiom

Research paper

A new paradigm for lung-conservative total liquid ventilation

Matthias Kohlhauer^{a,1}, Emilie Boissady^{a,1}, Fanny Lidouren^a, Ludovic de Rochefort^b,
Mathieu Nadeau^c, Jérôme Rambaud^a, Alice Hutin^a, Rose-Marie Dubuisson^d,
Geneviève Guillot^d, Pascaline Pey^e, Patrick Bruneval^f, Etienne Fortin-Pellerin^c, Michael Sage^c,
Hervé Walti^a, Alain Cariou^g, Jean-Damien Ricard^h, Alain Berdeaux^a, Nicolas Mongardon^{a,1},
Bijan Ghaleh^a, Philippe Micheau^{c,2}, Renaud Tissier^{a,*,2}

^a U955 – IMRB, Inserm, UPEC, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Créteil, France^b Aix Marseille Univ, CNRS, CRMBM UMR 7339, Marseille, France^c Université de Sherbrooke, Groupe Inolivent, Sherbrooke, Quebec, Canada^d IR4M UMR8081 CNRS Univ Paris-Sud, Université Paris Saclay, SHFJ, 4 place du Général Leclerc, 91401, Orsay Cedex, France^e Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna, Ozzano Emilia, Italy^f Inserm, UMR 970, Paris Cardiovascular Research Center, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France^g Service de Médecine Intensive et Réanimation, APHP, Centre, Université de Paris, Hôpital Cochin, Paris, France^h UMR 1137, Inserm, Université Paris Diderot, Hôpital Louis Mourier, Réanimation médico-chirurgicale, APHP, Colombes, France¹ Service d'Anesthésie-Réanimation Chirurgicale, Hôpitaux Universitaires Henri Mondor, Créteil, France

ARTICLE INFO

Article History:

Received 9 July 2019

Revised 6 August 2019

Accepted 12 August 2019

Available online 22 August 2019

Keywords:

Liquid ventilation

Critical care

Therapeutic hypothermia

Biomedical engineering

ABSTRACT

Background: Total liquid ventilation (TLV) of the lungs could provide radically new benefits in critically ill patients requiring lung lavage or ultra-fast cooling after cardiac arrest. It consists in an initial filling of the lungs with perfluorocarbons and subsequent tidal ventilation using a dedicated liquid ventilator. Here, we propose a new paradigm for a lung-conservative TLV using pulmonary volumes of perfluorocarbons below functional residual capacity (FRC).

Methods and findings: Using a dedicated technology, we showed that perfluorocarbon end-expiratory volumes could be maintained below expected FRC and lead to better respiratory recovery, preserved lung structure and accelerated evaporation of liquid residues as compared to complete lung filling in piglets. Such TLV below FRC prevented volutrauma through preservation of alveolar recruitment reserve. When used with temperature-controlled perfluorocarbons, this lung-conservative approach provided neuroprotective ultra-fast cooling in a model of hypoxic-ischemic encephalopathy. The scale-up and automating of the technology confirmed that incomplete initial lung filling during TLV was beneficial in human adult-sized pigs, despite larger size and maturity of the lungs. Our results were confirmed in aged non-human primates, confirming the safety of this lung-conservative approach.

Interpretation: This study demonstrated that TLV with an accurate control of perfluorocarbon volume below FRC could provide the full potential of TLV in an innovative and safe manner. This constitutes a new paradigm through the tidal liquid ventilation of incompletely filled lungs, which strongly differs from the previously known TLV approach, opening promising perspectives for a safer clinical translation.

Fund: ANR (COOLIVENT), FRM (DBS20140930781), SATT Idflnnov (project 273).

© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Abbreviations: ANOVA, analysis of variance; CT, computerized tomography; EV, expiratory volume of liquid; FiO₂, inhaled fraction of oxygen; FRC, functional residual capacity; HIE, hypoxic-ischemic encephalopathy; MRI, magnetic resonance imaging; PEEP, positive end-expiratory pressure; PFOB, perfluoroethylbromide; PCO₂, arterial blood carbon dioxide partial pressure; PO₂, arterial blood oxygen partial pressure; PLV, partial liquid ventilation; PFC, perfluorocarbon; ROI, region of interest; TLV, total liquid ventilation; TV, tidal volume

* Corresponding author at: Inserm, Unité 955, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, 7 avenue du Général de Gaulle, 94700, Maisons-Alfort, France.

E-mail address: renaud.tissier@vet-alfort.fr (R. Tissier).

¹ Both authors contributed equally to this work (co-first authors).

² Both authors contributed equally to this work (co-last authors).

1. Introduction

The development of protective mechanical ventilation was a major step forward for critically ill patients in intensive care units over the last decades. One of the next medical breakthroughs could be the use of total liquid ventilation (TLV) of the lungs with perfluorocarbons (PFC). This method consists in lungs filling with residual volumes of perfluorocarbons, above which a tidal volume of liquid is added and removed at each respiratory cycle. Importantly, TLV should not be confounded with partial liquid ventilation (PLV), which

<https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.026>

2352-3964/© 2019 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Research in context

Evidence before this study

Total liquid ventilation (TLV) consists in lungs filling with residual volumes of perfluorocarbons, above which a tidal volume of liquid is added and removed at each respiratory cycle using a dedicated liquid ventilator. This should not be confounded with the so-called “partial liquid ventilation”, which consists in lung filling with perfluorocarbons and further gaseous ventilation with a conventional ventilator. Until now, it was usually admitted that TLV should abolish the air-liquid interface through a complete filling of the lungs with liquids. When afforded with temperature-controlled perfluorocarbons, it can also use the lungs as heat exchangers and induce ultra-fast cooling and potent experimental neuroprotection after resuscitated cardiac arrest. The clinical translation of TLV was limited by the lack of dedicated ventilators and the need for long-term studies in clinically relevant conditions. Moreover, precise recommendations regarding ideal residual and tidal volumes during TLV were still needed until now.

Added value of this study

Here, we propose a radically new way of pulmonary ventilation for critical care situations. It consists in an automatized TLV of the lungs with liquid volumes below functional residual capacity (FRC) throughout the procedure. Using sophisticated and up-to-date engineering and imaging techniques, we evaluated both immediate and delayed effects of this procedure in several animal models, including non-human primates. We also demonstrated that TLV provides ultrafast cooling even in large animals and prevent neurological sequels following hypoxic brain injury.

Implications of all the available evidence

This study demonstrates that TLV could be induced in a totally safe and efficient manner using an accurate control of perfluorocarbon volume below FRC. This constitutes a new paradigm as our method consists in tidal liquid ventilation of incompletely filled lungs, which strongly differs from the previously known TLV approach, opening promising perspectives for a safer clinical translation. This also differs from partial liquid ventilation, that was shown to increase the rate of lung trauma due to “high-volume” ventilation in patients presenting with acute respiratory distress. This new paradigm of TLV below FRC could relaunch the clinical investigations with liquid ventilation in a safe manner. For instance, the clinical translation of TLV for ultra-fast cooling and neuroprotection could be considered in the near future after cardiac arrest.

parameters [17]. Recently, our group has developed a prototype that can continuously regulate expiratory flow as well as PFC volumes and pressures, which was a great cornerstone for TLV translation [18,19]. At this step, precise recommendations are still needed to provide an efficient procedure, regarding targeted PFC volumes, filling pressures and PFC target temperatures. This is particularly required after the negative clinical experiences with PLV, which produced volu- or barotrauma in patients presenting with acute-respiratory distress syndrome [2]. Even if TLV should not produce the same side effects through the primary of control liquid volumes throughout the respiratory cycle, this invites to be very cautious prior to any other trial with liquid ventilation. Here, our goal was therefore to properly assess the short and long-term effect of TLV at different levels of lung filling in highly clinically relevant conditions.

Therefore, we propose a new, fully safe and protective approach for TLV that allows tidal ventilation of the lungs after incomplete lung filling with PFC. We tested different strategies with various filling and tidal volumes and determined the procedure with the best tolerance through liquid redistribution into initially partly filled lungs rather than inflation of fully filled lungs. This showed that TLV could be much better tolerated when the lungs are filled below the expected volume of the functional residual capacity (FRC), despite incomplete initial degassing. We tested this approach in healthy piglets and further confirmed our results in pathophysiological conditions in a piglet model of hypoxic-ischemic encephalopathy. This confirmed that beyond being safe, this procedure could still be beneficial through its ultra-fast cooling properties. Then, we attempted to integrate the concept of TLV using liquid volumes below FRC using a new liquid ventilator. Beyond the automating of the whole process, we scaled up the technology and confirmed that TLV at residual volumes below FRC can provide a safe procedure while enabling the full potential of TLV in human adult-sized animals, as well as non-human primates. Such tidal liquid ventilation strongly differs from the previously known TLV approach, opening promising perspectives for a safer clinical translation.

2. Material and methods

The animal instrumentation and the ensuing experiments were conducted in accordance with French official regulations after approval by the ethical committee for animal use. Experimental protocols, designs of liquid ventilator and imaging methods are described as Supplementary Material and Methods.

2.1. Piglets preparation and follow-up

Piglets were anesthetized by zolazepam (25 mg/kg i.m.), tiletamine (25 mg/kg i.m.) and propofol (5–10 mg/kg i.v.). After endotracheal intubation, animals were submitted to conventional mechanical gas ventilation with tidal volume of 8 ml/kg and respiratory rate of 25 per min (Minerve, Esternay, France). Inhaled fraction of oxygen (FiO₂) was set at 30%. Animals received analgesics (buprenorphine, 30 µg/kg i.v.) and were paralyzed by the administration of vecuronium bromide (0.1 mg/kg i.v.). Catheters were inserted into the cephalic vein and the femoral artery for the continuous evaluation of mean arterial pressure and heart rate, respectively. Rectal temperature was also recorded throughout the procedures. Hemodynamic data were digitized (Hem, Notocord v4.2, Noisy-sur-Seine, France).

In a first set of experiments (safety experiment), newborn piglets were submitted to normothermic TLV without any initial injury, in order to evaluate proper pulmonary effects of the procedure. As described in detail as supplemental material, different conditions of expiratory volume of liquid (EV = 15 or 30 ml/kg) or tidal volume of liquid (TV = 8 or 16 ml/kg) were tested. In some experiments, a CT-scan was conducted and animals were euthanized at the end of the procedure. In other experiments, animals resumed to conventional mechanical ventilation after 30 min of TLV. They returned to spontaneous breathing after 5 h. Clinical recovery

consists in lung filling with PFC and further gaseous ventilation with conventional ventilator [1–3]. This failed to provide benefits in patients presenting with acute-respiratory distress syndrome [2]. More generally, PFC are also proposed for other medical applications such as aerosols for respiratory diseases [4,5], blood substitutes [6] or contrast product for imaging [7,8].

Due to the high solubility of the PFC for gases, TLV can ensure normal gas exchanges and provides pulmonary benefits [9], as shown in animal models of respiratory diseases [10–12]. When afforded with temperature-controlled PFC, it can also use the lungs as heat exchangers [13–16] and afford ultra-fast cooling and potent experimental neuroprotection after resuscitated cardiac arrest [13,14]. However, its clinical translation was limited by the lack of liquid ventilators able to adequately control PFC pulmonary flows during TLV and the absence of consensus regarding adequate respiratory

was then evaluated during 3 days before euthanasia and lung removal for post-mortem analysis. Animals were also submitted to a similar surgical procedure with 5 h of conventional mechanical ventilation without TLV (Sham group).

In the second set of experiments (efficiency experiment), animals were submitted to hypoxic-ischemic injury in order to evaluate the benefits of hypothermic TLV. Hypoxia-ischemia encephalopathy (HIE) was induced by 30 min of hypoxia at $\text{FiO}_2 = 10\%$, followed by an interruption of the mechanical ventilation and clamping of the endotracheal tube. After 7 min of respiratory arrest, and subsequent cardiac arrest, a cardiopulmonary resuscitation was started with manual chest compression, resumption of mechanical ventilation, increase of the inhaled fraction of oxygen (FiO_2) to 100% and bolus administration of epinephrine ($4 \mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.). The experimental design was set after preliminary experiments determining the balance between the severity of hypoxic-ischemic insult and the ability to obtain successful resuscitation after apnea. After resumption of spontaneous circulation, piglets were randomly allocated to the Control or TLV group. In the control group, piglets were maintained under conventional mechanical ventilation during 6 h after HIE induction. In the TLV group, piglets were rapidly cooled to 32°C by TLV according to the safest setting previously determined (EV = 15 ml/kg and TV = 8 ml/kg). An additional group of piglets was submitted to the surgical procedure with no hypoxia-ischemia (Sham group).

In all set of experiments, arterial blood samples were taken for the evaluation of blood pH, pCO_2 , pO_2 and lactate levels (Epoc, Kitvia, Labarthe-Inard, France). After awakening, animals were followed during 3 or 7 days in the safety or efficiency experiments, respectively. They received analgesics (buprenorphine, $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.m. b.i.d.) and appropriate cares throughout follow-up. Survival and clinical recovery was assessed. We evaluated the daily neurological function with a notation grid developed for piglets (Table S1). In accordance with our ethical committee, animals with a severe dyspnea or neurological dysfunction score higher than 70% at day 1 or 40% at day 2, respectively, were euthanized with an overdose of pentobarbital. At the end of the follow-up, all animals were euthanized and the lungs were withdrawn. Lung morphology was evaluated by histological evaluation. For the evaluation of the neurological protection afforded by hypothermic TLV (efficiency experiment), two catheters were inserted into the internal carotid arteries after euthanasia and brain was perfused with 4% paraformaldehyde. Brain was then collected and stained with Fluorojade-C. The number of degenerating neurons was evaluated in the cortex, caudate and putamen nuclei and hippocampus.

2.2. Adult pigs preparation and follow-up

Adult pigs weighing 60–70 kg were anesthetized by acepromazine ($1 \text{ mg}/\text{kg}$, i.m.), ketamine ($10 \text{ mg}/\text{kg}$, i.m.), propofol ($5\text{--}10 \text{ mg}/\text{kg}$, i.v.) and morphine ($0.1 \text{ mg}/\text{kg}$, i.v.). Anesthesia was maintained by inhaled isoflurane (2.5%). After endotracheal intubation, pigs were paralyzed (rocuronium, $6 \text{ mg}/\text{kg}$, i.v.) and submitted to conventional mechanical ventilation (TV of 8 ml/kg and respiratory rate of 10 per min; $\text{FiO}_2 = 30\%$). An arterial catheter was inserted into the caudal artery for mean arterial pressure monitoring and arterial blood sampling. Rectal, tympanic, oesophageal and vesical temperature probes were inserted for the evaluation of body cooling in different compartments during TLV. The exact procedure is described as supplemental material.

After 30 min of TLV, conventional mechanical ventilation was resumed. They were progressively rewarmed and awakened after 6 h. They returned to animal facility with no oxygen supplementation. All pigs were followed for 10 days after the TLV procedure for clinical respiratory function assessment. They received analgesics and appropriate care. At the end of the follow-up, animals were euthanized by an overdose of pentobarbital and heart-lungs were withdrawn for immediate evaluation of PFC residues in lungs by *ex vivo* CT-scan imaging. After imaging, we sampled representative

tissue of each lobe of the lungs and stored them in formaldehyde 4%. Conventional histology was then performed on these samples.

2.3. Macaques preparation and follow-up

Two 13-years aged adults monkeys (*Macaqua Fascicularis*) weighting 10.6 and 11.7 kg were enrolled in the study. They underwent an initial anesthesia using a mixture of dexmedetomidine ($15 \mu\text{g}/\text{kg}$ i.m.) and ketamine ($3 \text{ mg}/\text{kg}$ i.m.) for an initial CT-scan examination, as described in supplemental material. Two-weeks later, they were reanesthetized and intubated for mechanical ventilation (respiratory rate = 20 cycles/min; $\text{VT} = 8 \text{ ml}/\text{kg}$). Anesthesia was maintained by alphaxan ($6 \text{ mg}/\text{kg}/\text{h}$). After the administration of rocuronium ($6 \text{ mg}/\text{kg}$, i.v.), animals underwent 20 min of hypothermic TLV using the automated and up-scaled ventilator previously used in large pigs. EV and TV were maintained at 15 and 8 ml/kg throughout TLV. Respiratory rate was set at 6 cycles/min. The temperature of the PFC was controlled as previously described to cool body core to 32°C . After TLV, animals resumed to conventional mechanical ventilation during 6 h for slow rewarming using external pads. After awakening, animals underwent a close clinical follow-up. Three weeks later, they were sedated for a very short period using dexmedetomidine for blood samples withdrawing and respiratory gas exchanges evaluation. Animals were awakened rapidly using the anesthetics antagonist atipamezole. A last anesthesia was conducted four weeks later for a final CT-scan examination and evaluation of lung parenchyma integrity. Since no any abnormality was observed, animals were thereafter hosted in a rehabilitation center.

2.4. Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM or, when indicated, as individual values and medians. Statistical analysis were conducted using a dedicated software (Sigmastat, Systat software, San Jose, CA, USA). Continuous parameters were compared between groups using either one-way ANOVA or 2-way ANOVA for repeated measures, depending upon the parameters. These analyses were followed by a Hold-sidak analysis if necessary. Values were not compared between the different time points to avoid multiple comparisons. Neurological scores were compared using a Kruskal-Wallis analysis followed by a Mann-Whitney test. Survival was compared between groups using a log-rank test. Significant differences were determined at $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1. Acute effects of total liquid ventilation with different conditions of lung filling

In preliminary experiments, we assessed lung volume by chest computerized tomography (CT-scan) in four anesthetized piglets. As illustrated by Fig. 1, lung end-expiratory volume achieved $13.8 \pm 1.8 \text{ ml}/\text{kg}$ and $37.7 \pm 8.8 \text{ ml}/\text{kg}$ at PEEP = 0 and 5 cmH_2O , respectively. It is consistent with previous findings showing physiological FRC in the middle of this range, around 25–30 ml/kg in babies [20]. Accordingly, we decided to evaluate the effect of TLV with end-expiratory volumes of PFC (EV) close to these “extreme” physiological volumes, i.e., below or close to estimated FRC at either 15 or 30 ml/kg, respectively. We used a dedicated device for small animals [18,19], as illustrated by Fig. 2A and Suppl. Fig. S1. TLV was induced with perfluorobromide (PFOB) TLV [21,22]. As illustrated in Fig. 2B, we crossed the evaluation of the two selected EV levels with two different levels of tidal volume (TV) set at either 8 or 16 ml/kg ($\text{TV}_8\text{-EV}_{15}$, $\text{TV}_{16}\text{-EV}_{15}$, $\text{TV}_8\text{-EV}_{30}$, $\text{TV}_{16}\text{-EV}_{30}$ groups, respectively). In all groups, animals were submitted to 30 min of TLV ($n = 5$ in each group), with respiratory rate fixed to maintain similar respiratory minute volume in all groups (i.e., 9 vs 4.5 cycles in the groups with TV = 8 or 16 ml/kg, respectively). An additional group of Sham animals were submitted to conventional gas ventilation without TLV ($n = 5$).

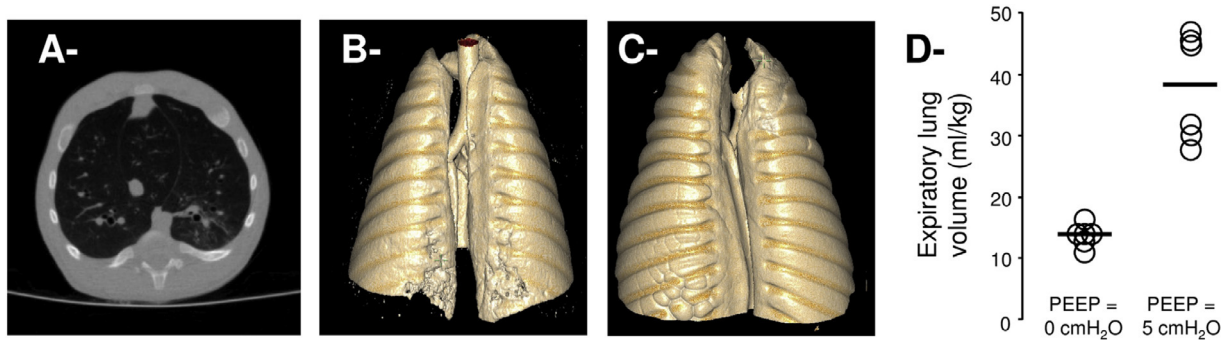


Fig. 1. Evaluation of lung volumes in normal conditions in anesthetized piglets submitted to gas ventilation. A- Picture of a thoracic computerized tomography (CT)-scan in one anesthetized piglet during mechanical ventilation. Images were obtained during prolonged expiratory pause. B- 3D reconstruction of the lung with an acquisition during a prolonged expiratory pause with positive end-expiratory pressure (PEEP) set at 0 cmH₂O. C- 3D reconstruction of the lung with an acquisition during a prolonged expiratory pause with positive end-expiratory pressure (PEEP) set at 5 cmH₂O. D- Measured lung volumes in 6 piglets during a prolonged expiratory pause at PEEP = 0 or 5 cmH₂O. Circles represent individual values and bold line mean values in each condition, respectively.

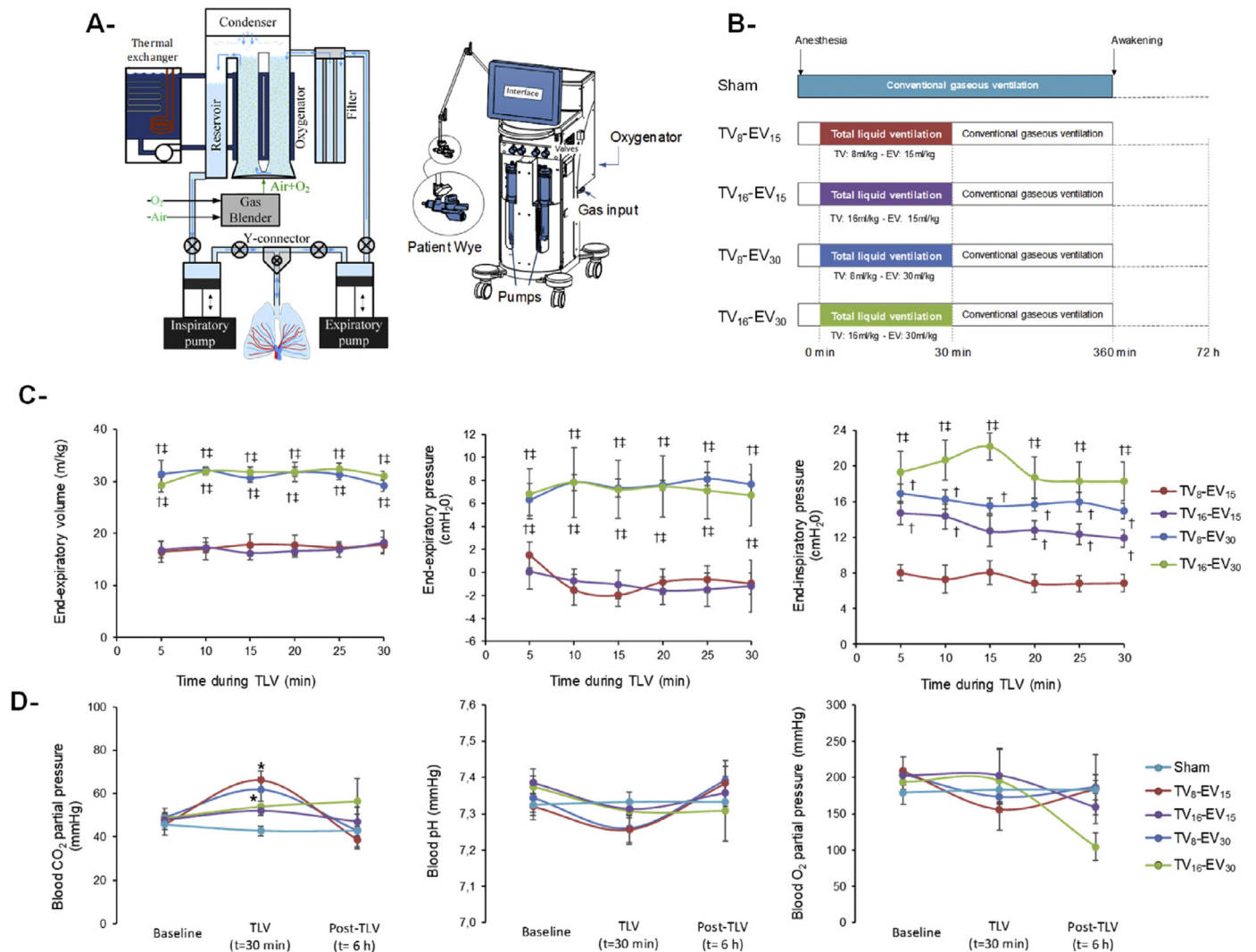


Fig. 2. Evaluation of different ventilation strategy for total liquid ventilation in piglets. A- Schematic representation of the liquid ventilators for TLV, including piston pumps and valves to drive the liquid into and from the lung, thermal exchanger, condenser for perfluorocarbon condensing and oxygenator. The liquid ventilator also includes sensors, graphic user interface and electronic algorithm to control the entire process [19]. B- Experimental protocol including five groups of piglets submitted to 30 min of TLV with different tidal volumes (TV of 8 or 16 ml/kg) and end-expiratory volumes (EV of 15 or 30 ml/kg), as compared to Sham animals with conventional mechanical ventilation only. The four corresponding groups are so-called TV₈-EV₁₅, TV₁₆-EV₁₅, TV₈-EV₃₀ and TV₁₆-EV₃₀, respectively. C- Volumes of perfluorocarbons within the lungs at the end of expiration during TLV and static pulmonary pressures measured during end-expiratory and end-inspiratory pauses, respectively. D- Blood pH and carbon dioxide and oxygen partial pressure (pCO₂ and pO₂, respectively). *, p < 0.05 vs Sham; †, p < 0.05 vs TV₈-EV₁₅; ‡, p < 0.05 vs TV₁₆-EV₁₅.

As illustrated by Fig. 2C, the target EV of 15 and 30 ml/kg were roughly maintained throughout TLV in the corresponding groups. Surprisingly, end-expiratory static pressure was negative in the two groups with EV set at 15 ml/kg, as compared to +6–8 cmH₂O in the groups filled with 30 ml/kg of EV (Fig. 2C). This peculiar finding can be explained by the active exhalation driven by the piston pump during TLV. In the TV₈-EV₁₅ and TV₈-EV₃₀ groups, this led to slight depression and could suggest that the actual EV was yet below FRC. End-inspiratory alveolar pause pressure also increased along with TV and EV in the different groups, achieving a maximal value ≈20 cmH₂O in TV₈-EV₃₀. As shown in Fig. 2D, blood oxygenation and pH were not significantly modified during TLV in the different groups vs Sham animals. However, a significant increase in arterial blood CO₂ pressure (pCO₂) was observed in TV₈-EV₁₅ and TV₁₆-EV₁₅ groups as compared to Sham. This could be expected as TLV parameters were fixed by the study design and no change in respiratory rate was allowed during TLV. Heart rate and mean arterial pressure were not modified by TLV as compared to Sham (Suppl. Fig. S2).

3.2. Animal recovery after total liquid ventilation

After the episode of 30 min of TLV, the piglets were submitted to 5 h of conventional mechanical ventilation, after which they were weaned from ventilation and awakened. Oxygen enrichment was permitted

during 24 h using semi-hermetic cages. After return to spontaneous breathing, gas exchange and hemodynamic parameters were not significantly modified in animals previously submitted to TLV vs Sham (Fig. 2D and Suppl. Fig. S2). A non-significant decrease in pO₂ was observed in TV₁₆-EV₃₀ as compared to other groups (Fig. 2D). Yet, two animals of this very group rapidly presented severe acute respiratory failure after awakening. They were euthanized and gross post-mortem analysis showed macroscopic lung congestion and hemorrhage.

The days after TLV, animals from the TV₈-EV₁₅, TV₁₆-EV₁₅ and TV₈-EV₃₀ groups did not show any sign of respiratory dysfunction as compared to Sham. These animals were followed during 3 days with no sign of acute respiratory discomfort. Conversely, respiratory discomfort and dyspnea were observed in the three surviving animals from the TV₁₆-EV₃₀ group. Respiratory rate achieved 145 ± 9 breaths/min after 24 h, as compared to 41 ± 8 breaths/min in Sham animals (p < 0.05). Two animals were euthanized for persistent polypnea after 24 h in the TV₁₆-EV₃₀ group and the last one after 48 h following TLV, respectively.

3.3. Morphological effects of total liquid ventilation on lung structure and evaluation of perfluorocarbons residues

All animals were euthanized at the end of the clinical follow-up for post-mortem analysis. A dual-nuclei magnetic resonance imaging (MRI)

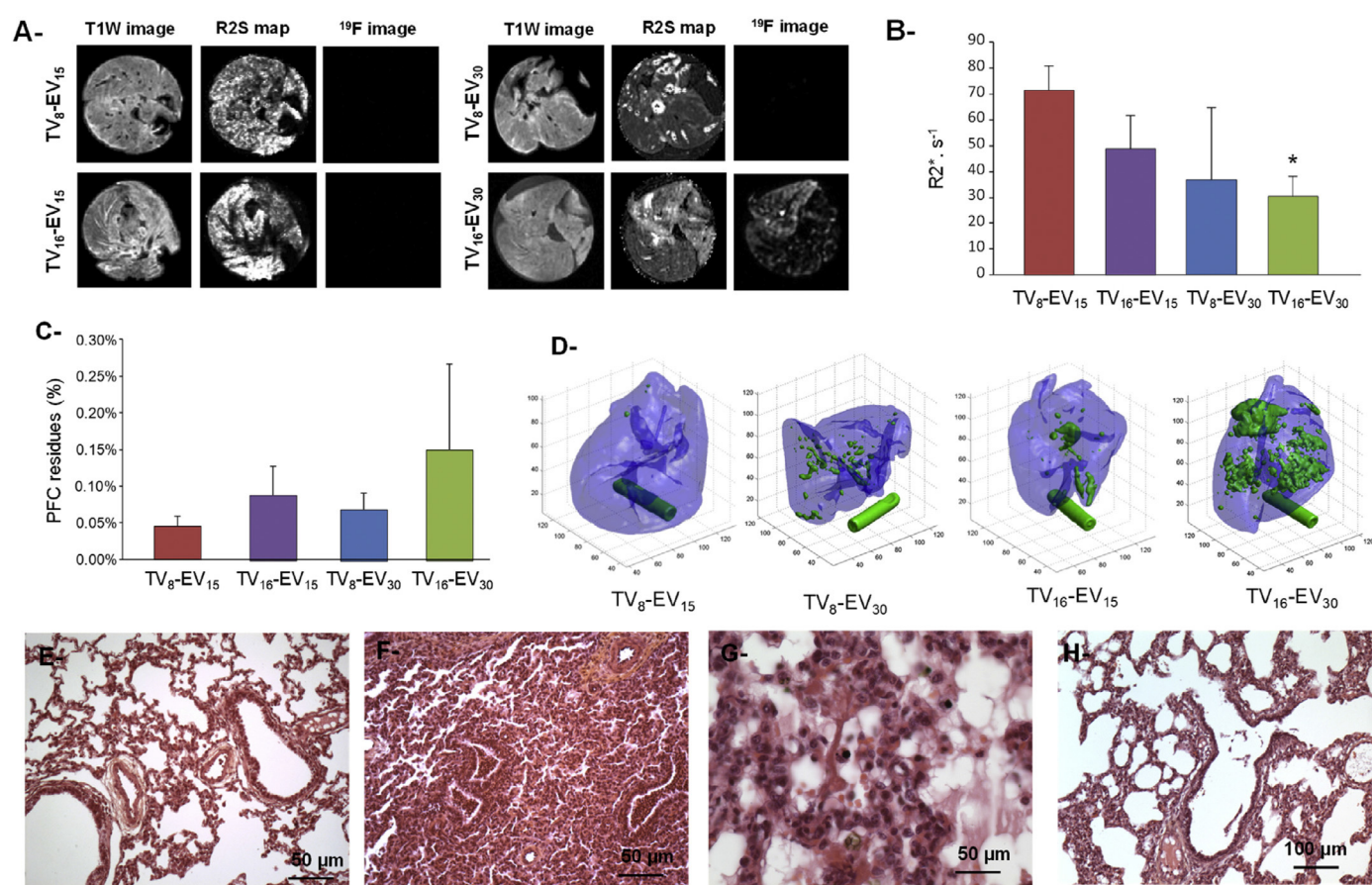


Fig. 3. Morphological alterations and perfluorocarbon (PFC) residues in the different groups of piglets submitted to total liquid ventilation (TLV). A- Typical appearance of lung parenchyma on magnetic resonance imaging using T1W sequence, apparent transverse relaxation rate (R2*) map and ¹⁹F dual-nuclei imaging in piglets from the different groups. The T1W allows visualizing lung parenchyma and anatomy. Reduced R2* suggests enhanced hemorrhage or edema in the TV₁₆-EV₃₀ group [32]. ¹⁹F signal shows PFC residues. B- Average value of apparent transverse relaxation rate R2* in the entire lungs in the different groups. Low values indicate morphological alterations including hemorrhage and pulmonary edema. C- Average volume of PFC residues in the different groups (as percentage of entire lung volume). D- 3-D reconstruction of entire lungs after ¹⁹F dual-nuclei imaging. Blue and green areas represent lung parenchyma and PFC-filled spots, respectively. A tube filled with 100% PFC is located under the sample for absolute quantification of ¹⁹F images. E- Normal pulmonary histological appearance in a Sham piglet. F- Abnormal pulmonary histological appearance in a Sham piglet demonstrating interstitial inflammation and foci of bronchiolitis. G- Abnormal pulmonary histological appearance in a piglet from the TV₁₆-EV₃₀ group including hyaline membranes, alveolitis, hemorrhage and serous edema. H- Abnormal pulmonary histological appearance in a piglet from the TV₁₆-EV₃₀ group demonstrating alveolar and bronchiolar distension. *, vs TV₈-EV₁₅; See legend in Fig. 1. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

protocol was developed for the concomitant analysis of lung lesions and PFC residues in the entire lungs (Fig. 3A and Suppl. Fig. S3). As illustrated in Fig. 3A and B, average relaxation rate $R2^*$ was significantly decreased in $TV_{16}-EV_{30}$, but not TV_8-EV_{30} and $TV_{16}-EV_{15}$, as compared to TV_8-EV_{15} , evidencing hemorrhage or pulmonary edema in the first group. Along with these abnormalities on $R2^*$ mapping, ^{19}F dual imaging also showed a non-significant increase in the amount of PFC residues in the $TV_{16}-EV_{30}$ group as compared to the three other groups (Fig. 3C). As illustrated by Fig. 3D, the 3D reconstruction of lung parenchyma (in blue) indeed showed that PFC residues (in green) were more frequent and localized in the $TV_{16}-EV_{30}$ group, as compared to others. It is reasonable to hypothesize that PFC persistence was linked to parenchymal alterations that slow or inhibit PFC elimination.

The histological examinations of the lungs confirmed severe pulmonary alterations in the $TV_{16}-EV_{30}$ as compared to all other groups. Indeed, we observed normal appearance in the Sham, TV_8-EV_{15} , $TV_{16}-EV_{15}$ and TV_8-EV_{30} groups (Fig. 3E, respectively). We only observed non specific foci of infection in some areas (Fig. 3F). In the $TV_{16}-EV_{30}$, we observed typical alterations of diffuse alveolar damage including severe alveolitis, alveolar hemorrhage and hyaline membranes (Fig. 3G). Some areas showed alveolar or bronchiolar dilation with a typical “balloon-like” pattern compatible with overdistension in the latter group (Fig. 3H).

3.4. Repartition of perfluorocarbons during total liquid ventilation and consequences on lung mechanics

In order to understand PFC distribution during TLV, we submitted two additional anesthetized piglets to chest CT-scan imaging during

TLV with 15 min at TV_8-EV_{15} and then 10 min at each other conditions ($TV_{16}-EV_{15}$, TV_8-EV_{30} and $TV_{16}-EV_{30}$). PFOB could be identified easily as it is highly hyperattenuating as compared to lung parenchyma. As illustrated by Fig. 4A, CT-scan confirmed incomplete lung filling in the TV_8-EV_{15} , $TV_{16}-EV_{15}$ and TV_8-EV_{30} conditions, as compared to $TV_{16}-EV_{30}$. Under the first two conditions (EV of 15 ml/kg), upper lobes appeared completely free of PFC. Under the two other conditions (EV of 30 ml/kg), upper lobes contains PFC but the density was attenuated as compared to the lower lobes, suggesting still incomplete filling in those upper lobes. The relative abundance of PFOB was then further assessed within different pulmonary regions of interest (Fig. 4B). The calculated percentage of PFOB within each region of interest was plotted against the total volume of liquid into the lung (Fig. 4C). It confirmed that lower and intermediate regions of interest are maximally filled by the PFC, even at low total volumes. Conversely, the upper regions of interest are empty at low volumes and received the additional PFC when the volume increases (Fig. 4D). This area could act as a protective alveolar recruitment reserve at low EV, while overdistension could occur at higher EV, e.g., in the $TV_{16}-EV_{30}$ group. In the latter group, the PFC content was dramatically increased in the upper (sternal) ROI at inspiration (46 ml/kg of PFOB in the entire lungs), confirming that TLV exceeding FRC in those conditions.

We further evaluated the pressure–volume relationship in two piglets during lung filling with increasing volumes of PFC. As illustrated in Fig. 4D, two slope breaks were evidenced after the administration of approximately 20 and 40 ml/kg of PFC, respectively. At 20 ml/kg, the first change likely corresponds to the beginning of

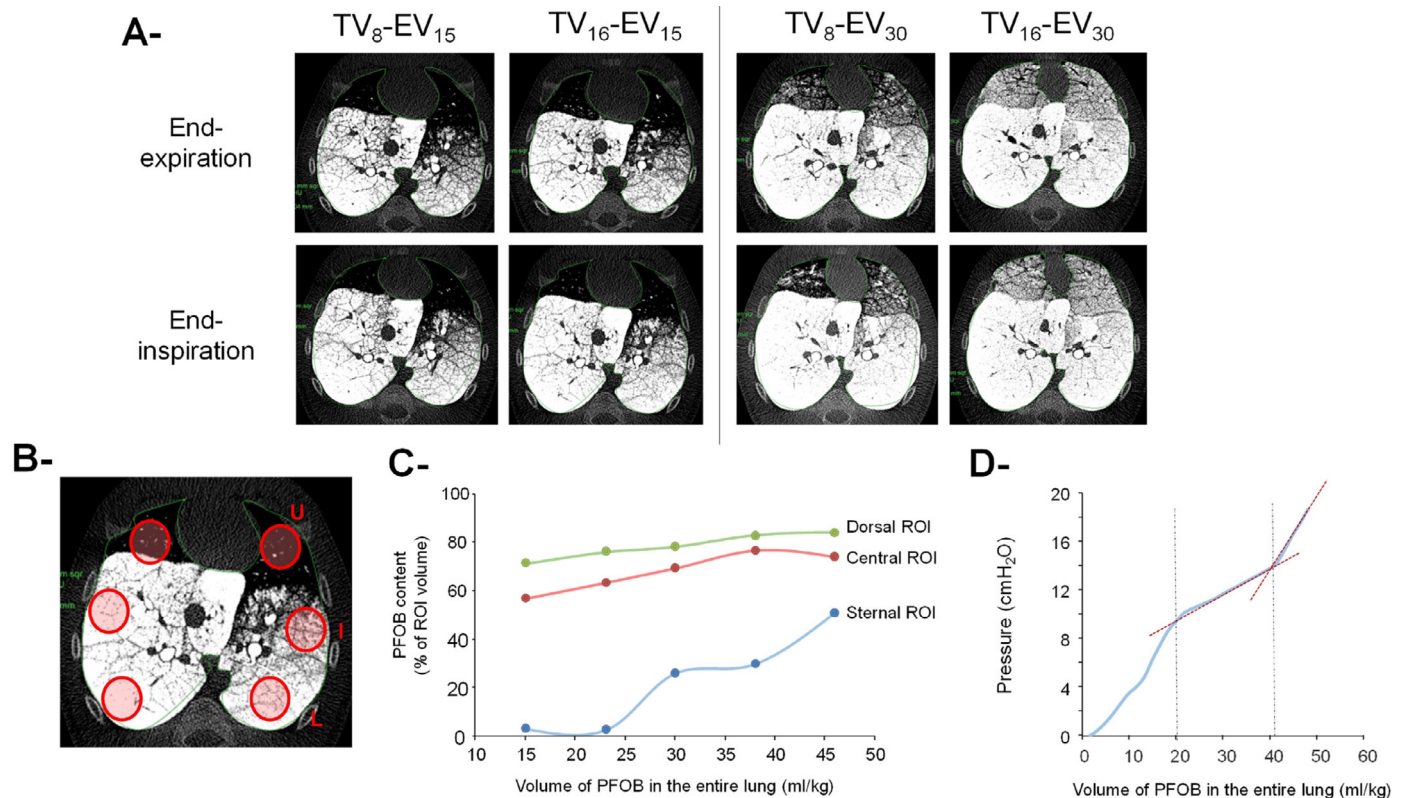


Fig. 4. Evaluation of perfluorocarbons (PFC) pulmonary repartition during total liquid ventilation (TLV) in piglets. A- Transverse images of thoracic computerized tomography (CT-scan) during prolonged pauses at end-inspiration or end-expiration in one anesthetized piglet positioned in dorsal recumbency and submitted to TLV with various end-expiratory or tidal volumes (EV and TV set at 8/16 and 15/30 ml/kg, respectively). B- Lung regions of interest (ROI) on a typical thoracic CT-scan picture. The amount of perfluocetyl bromide was calculated in each ROI, taking into account its own attenuation as compared to lung normal attenuation (+2300 and -600 Hounsfield Units, respectively). The so-called zones U, I and L corresponds to upper (sternal), intermediate and lower (dorsal) ROI. C- Amount of PFOB in each ROI, along with the total volume of PFC in the lungs. A pooled analysis was done among inspiration and expiration measurement. Five points were analyzed with the following expected volumes: 1) 15 ml/kg (expiration in TV_8-EV_{15} and $TV_{16}-EV_{15}$ conditions), 2) 24 ml/kg (inspiration in TV_8-EV_{15} conditions), 3) 30–31 ml/kg (inspiration in $TV_{16}-EV_{15}$ and expiration in TV_8-EV_{30} and $TV_{16}-EV_{30}$ conditions), 4) 38 ml/kg (inspiration in TV_8-EV_{30} conditions) and 5) 46 ml/kg (inspiration in $TV_{16}-EV_{30}$). Mean values were calculated in case of replication, at 15 and 30–31 ml/kg. D- Relationship between pulmonary pressure and PFC volume during a slow instillation into the trachea in a piglet. Dashed red lines emphasize inflexion points. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

alveolar recruitment of the upper region of the lung. At 40 ml/kg, the second slope break likely corresponds to an overdistension of already completely filled lungs. Interestingly, this happens at rather low alveolar pressures, averaging 15 cmH₂O.

3.5. Protective approach for total liquid ventilation after experimental hypoxic-ischemic encephalopathy in newborns

Beyond determining safe parameters, we then assessed whether this conservative approach of TLV could still provide the full potential of TLV benefits in piglets. Accordingly, we aimed at investigating the neuroprotective effect of hypothermic TLV in a model of pediatric cardiac arrest and neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE). HIE was induced by 30 min of hypoxia (FiO₂ lowered at 10%) and 7 min of apnea in anesthetized and paralyzed piglets. Animals were resuscitated using external chest compression and epinephrine administration. As illustrated by Fig. 5A, piglets were either submitted to a normothermic follow-up (38 °C, Control group; n=6) or to hypothermic TLV started 5 min after resuscitation (TLV group; n=6). In the latter group, TLV was maintained during 30 min with a target temperature of 33 °C and lung-conservative liquid ventilation (EV and TV=15 and 8 mL/kg, respectively). Animals subsequently resumed to conventional gas ventilation for hypothermia maintenance with external blankets during 3 h under conventional mechanical ventilation. In both Control and TLV groups, animals were

weaned from mechanical ventilation after 6 h following HIE injury. A third group was submitted to conventional mechanical ventilation without hypoxia-ischemia (Sham group; n=4).

As illustrated by Suppl. Fig. S4, the lung-conservative approach of TLV did not alter its capacity to maintain correct gas exchanges as compared to conventional ventilation and its ability to induce ultra-fast cooling in pathophysiological conditions. For instance, temperature achieved the 33 °C threshold within 10 to 20 min after TLV in oesophageal and rectal compartments, respectively (Suppl. Fig. S4A).

Animals were followed during 7 days after awakening. In the Control group, one animal died before the neurological evaluation at day 1 and all others were euthanized prematurely for severe neurological dysfunctions such as cerebral palsy or seizures. In the TLV group, neurological recovery was improved and only three animals presented a neurological dysfunction requiring premature euthanasia. Neurological dysfunction score was significantly attenuated in TLV vs Control groups at day 2 after HIE (Fig. 5B). Blood concentrations of brain injury biomarker S100B also evidenced a high increase at the time of euthanasia in Control but not TLV groups as compared to Sham (Fig. 5C). The benefits of TLV are also illustrated by survival analysis over the 7 days of follow-up in Fig. 5D. Histological analyses of the brain further confirmed a significant reduction in degenerating neurons count after euthanasia in the TLV vs Control groups (Fluoro-jade C staining, Fig. 5E and F). This shows the potent neuroprotective potential of hypothermic TLV.

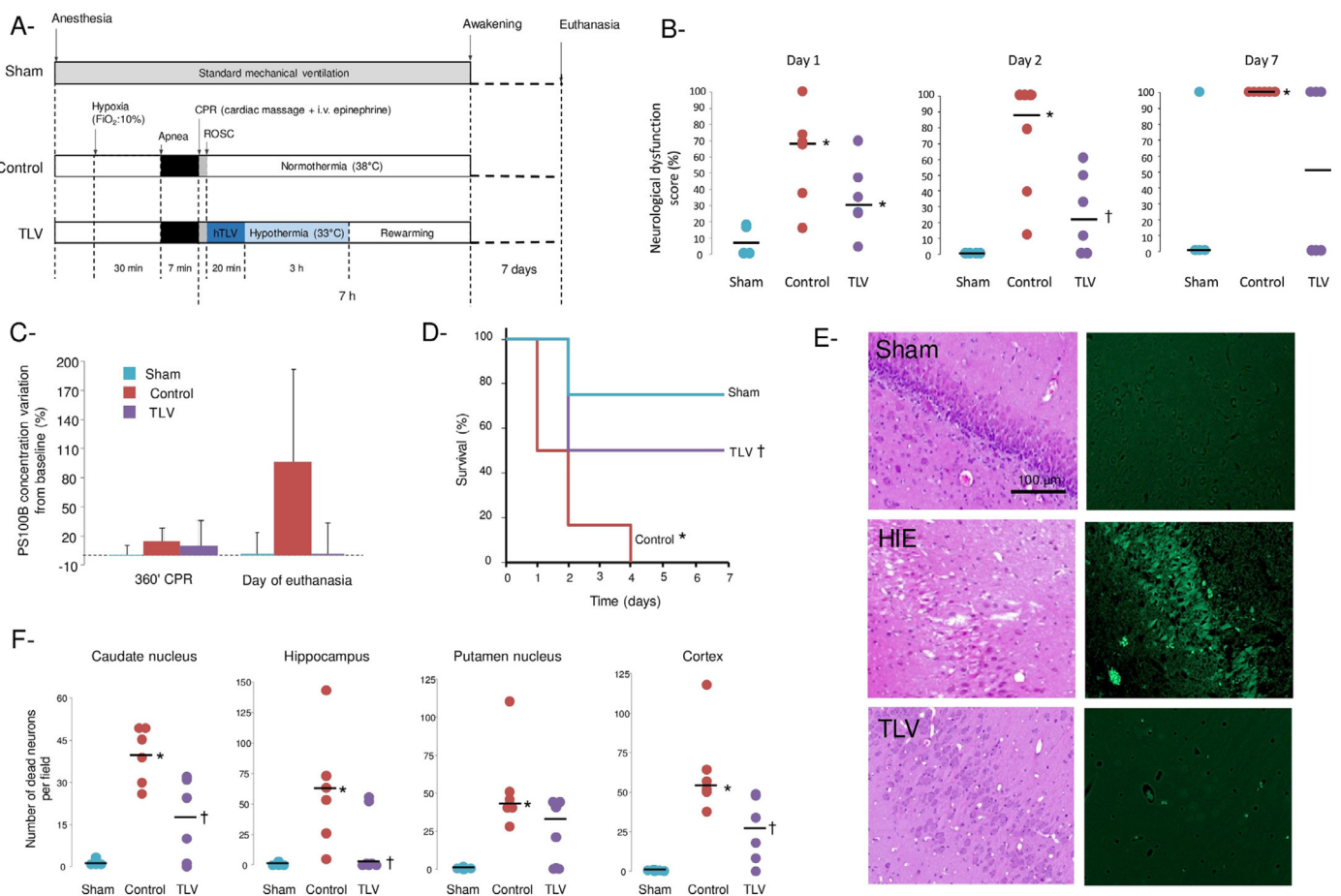
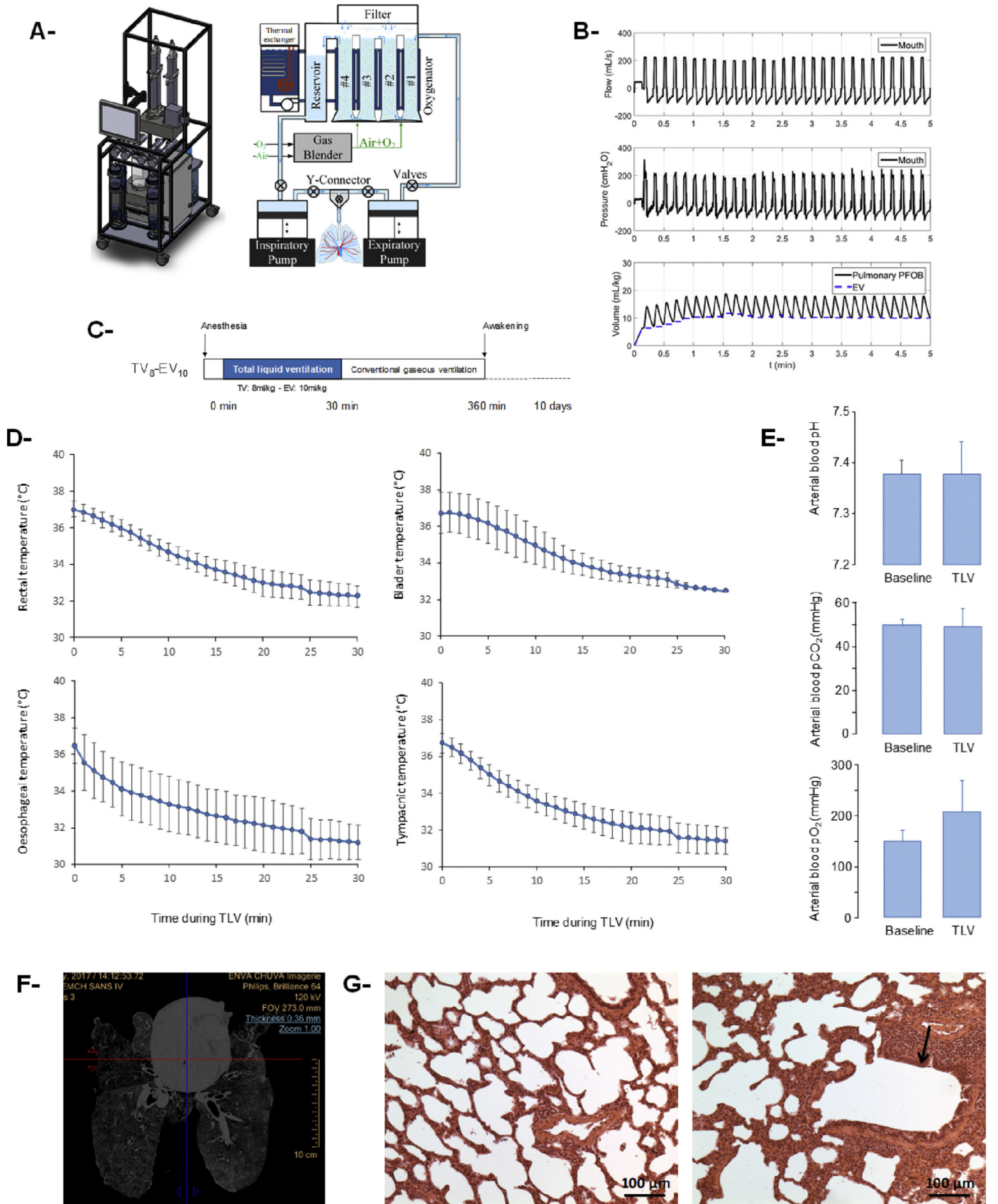


Fig. 5. Evaluation of lung-conservative total liquid ventilation (TLV) in pathophysiological condition of hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE) in piglets. A- Experimental protocol describing the hypoxic-ischemic injury. After resuscitation, animals were either treated by conventional mechanical ventilation under normothermia (Control group) or hypothermic TLV. A third group was submitted to a Sham procedure with no HIE induction. B- Neurological dysfunction scores after HIE induction or Sham procedure (0% = lack of dysfunction; 100% = death). Open circles and bold lines represent individual and median values, respectively. C- Blood concentration of the S100B protein as a marker of brain injury. D- Kaplan-Meier survival curves in all experimental groups. E- Typical histological appearance of the hippocampus after hemalun-eosin and fluorojade-C staining (left and right column rows, respectively). The latter staining show no or very few degenerating neurons in Sham and TLV groups, as compared frequent degenerating neurons in Control group. F- Number of positive fluoro-Jade C cells, expressed as mean number per analyzed field, in each areas of interest of the central nervous system. *, $p < 0.05$ vs Sham; †, $p < 0.05$ vs Control.



3.6. Technology up-scale for automatized TLV in large animals

The previous experiments showed that lung-conservative approach of TLV could provide safe TLV with full benefits in both physiological and pathophysiological conditions in piglets. One would argue that those findings could not be extrapolated in large animals due to higher body mass, chest size and lung maturity. Accordingly, we up-scaled our liquid ventilator and designed a technology for large animals up to 100 kg. All the components were adapted with specific materials for medical applications (Fig. 6A). In addition, we aimed at automatizing the TLV process. A specific algorithm was developed to estimate the volume of liquid into the lungs and maintain EV at a given target, as we demonstrated that it was a critical parameter. Thereby, expiratory TV was continuously and automatically modified by the ventilator to exactly maintain the EV set by the investigator (Fig. 6B). Similarly, PFC initial temperature and rewarming rate was calculated [16], as our main goal was here to use TLV for the induction of rapid hypothermia.

3.7. Total liquid ventilation using the same approach could provide ultrafast cooling and safety in large pigs

Relevant settings for TLV in large animals were determined by preliminary experiments (See Supplemental Material and Methods). As illustrated in Fig. 6C, four pigs weighing 67 ± 3 kg were submitted to 30 min of TLV with TV and EV set at 8 and 10 ml/kg, respectively (Suppl. Fig. S5). It allowed to maintain EV below FRC. The target temperature range of 31–33 °C was achieved within <20 min in the entire body (Fig. 6D). Gas exchanges were normal after 30 min of TLV as compared to baseline ventilation (Suppl. Fig. S5). After 30 min of TLV, animals resumed to conventional gas ventilation and were slowly rewarmed. They were weaned from ventilation within 4 to 6 h, after which they returned to the animal room without any oxygen supplementation. All animals presented an excellent recovery with no sign of respiratory discomfort. Blood oxygen saturation remained above 97–98% in all animals from the first day after TLV to the end of the follow-up (Fig. 6E). After 10 days, they were euthanized for lung harvesting. As illustrated in Fig. 6F, CT-scan imaging of explanted lungs did not show any visible macroscopic foci of PFC residues since the entire lung parenchyma was diffusely hypoattenuating. Histological analysis also revealed normal appearance in both inferior and superior lung regions. In some areas, mild alveolar or bronchiolar dilation were only observed with minor thickening of the alveolar wall, as typically observed after mechanical ventilation (Fig. 6G). No any lesion of alveolitis or alveolar damage was observed. This confirms that the incomplete lung filling with low volumes of PFC was perfectly tolerated in the different regions. The lung-conservative approach of TLV with lung filling below FRC then provided a safe procedure with full potential regarding gas exchanges and ultrafast cooling properties in large animals.

3.8. Validation of the concept of lung-protective liquid ventilation in non-human primates

In order to demonstrate the ultimate safety of the lung-conservative approach of TLV with lung filled below FRC, we confirmed our results in mature and aged non-human primates. Indeed, previous

results were only obtained in new born or young adults pigs. One would also argue that the poor tolerance of partial liquid ventilation in a previous clinical trial in humans could suggest a particular sensitivity of primates to liquid ventilation [2]. Therefore, we conducted an ultimate experiment in aged non-human primates in order to rule out any species or age specificity. We enrolled two 13-years monkeys (*Macaca fascicularis*) weighting 10.6 and 11.7 kg, respectively. This allowed evaluating lung-conservative TLV in old animals for which ageing could alter the response to TLV, which was never tested previously to our knowledge. Animals underwent a first anesthesia for CT-scan examination of the lung parenchyma (Fig. 7A) and evaluation of baseline FRC after 3D-reconstruction of the lung (Fig. 7B). We obtained FRC values averaging 26 and 32 ml/kg for the two animals, respectively. This is consistent with the expected FRC in primates. Then, we decided to test lung-conservative TLV targeting EV and TV of 15 and 8 ml/kg, respectively, which allowed remaining below FRC throughout TLV. Two weeks after the initial CT-scan, monkeys were indeed reanesthetized and submitted to 20 min of TLV with temperature-controlled PFC. As illustrated by Fig. 7C, rectal temperatures decreased very rapidly and achieved a target temperature of 32 °C in the entire body within 15 min. Lung compliance was not modified by TLV, demonstrating a lack of immediate lung trauma (Fig. 7D). The acute tolerance of TLV was also excellent regarding hemodynamics (Suppl. Table 2) or gas exchange (Fig. 7E). After TLV, monkeys were rewarmed under conventional mechanical ventilation during 6 h. Then, they were weaned from ventilation and awakened without any sign of dyspnea or hypoxemia. During the further follow-up, respiratory function was completely normal and no behavioral change was observed. Three weeks after the TLV procedure, gas exchanges were again evaluated and showed normal values for arterial pH, CO₂ partial pressure or oxygen saturation (Fig. 7E). Another CT-scan analysis was also conducted 4 weeks after TLV, which demonstrated no any sign of lung parenchyma abnormalities (Fig. 7F and G). Thanks to the excellent clinical status of the animals and the lack of any sequels following the TLV episode, we decided to transfer both monkeys to a rehabilitation center.

4. Discussion

Here, we propose a new approach for TLV through incomplete lung filling with PFC below FRC and subsequent tidal liquid ventilation. This represents a radical paradigm shift as compared to previous beliefs [10,11], that considered that lungs should be primarily completely filled with PFC and fully degassed since the filling phase. This lung-conservative approach of TLV was further automatized with an up-scaled device for large animals continuously controlling EV below FRC ranges. PLV was tested in humans but the largest trial raised skepticism regarding the actual safety of this procedure [2]. Those negative results were poorly deciphered a posteriori and it was often overstated that any way of liquid ventilation enhanced trauma risks by itself, regardless its exact way of induction. Therefore, it was critical to evaluate lung mechanics precisely during TLV and its delayed consequences after resumption to spontaneous breathing. Here, we show that TLV could be induced safely when controlling EV below expected FRC. This procedure was still able to provide ultrafast cooling in piglets and large pigs, as well as in non-human primates, reinforcing previous results in small animals. We confirmed

Fig. 6. Evaluation of total liquid ventilation with a new dedicated technology for large pigs. A- Schematic representation of the new specifically designed liquid ventilator. B- Typical perfluorocarbon flow (upper raw), pressure at mouth and pulmonary volume of perfluorocarbon during the first 5 min of total liquid ventilation (TLV) in a 63 kg pig. C- Schematic representation of experimental protocol in large pigs submitted to 30 min of hypothermic TLV followed by conventional gaseous ventilation and rewarming, before awakening. Animals were followed during 10 days before euthanasia for post-mortem analyses. D- Body temperatures in the different compartments during the TLV episode, showing a rapid decrease of target temperature (32–33 °C) within 20 min in all compartments. E- Blood pH and carbon dioxide and oxygen partial pressure (pCO₂ and pO₂, respectively). F- Thoracic computerized tomography (CT-scan) of an explanted lung in a pig at the end of the follow-up. No macroscopic foci of perfluorocarbons can be observed, suggesting complete elimination. G- Morphological appearance of the lung upon histological examinations. The left panel shows normal appearance. The right panel show an area with dilation of bronchioles (arrow) and alveolae, as typically observed after mechanical ventilation.

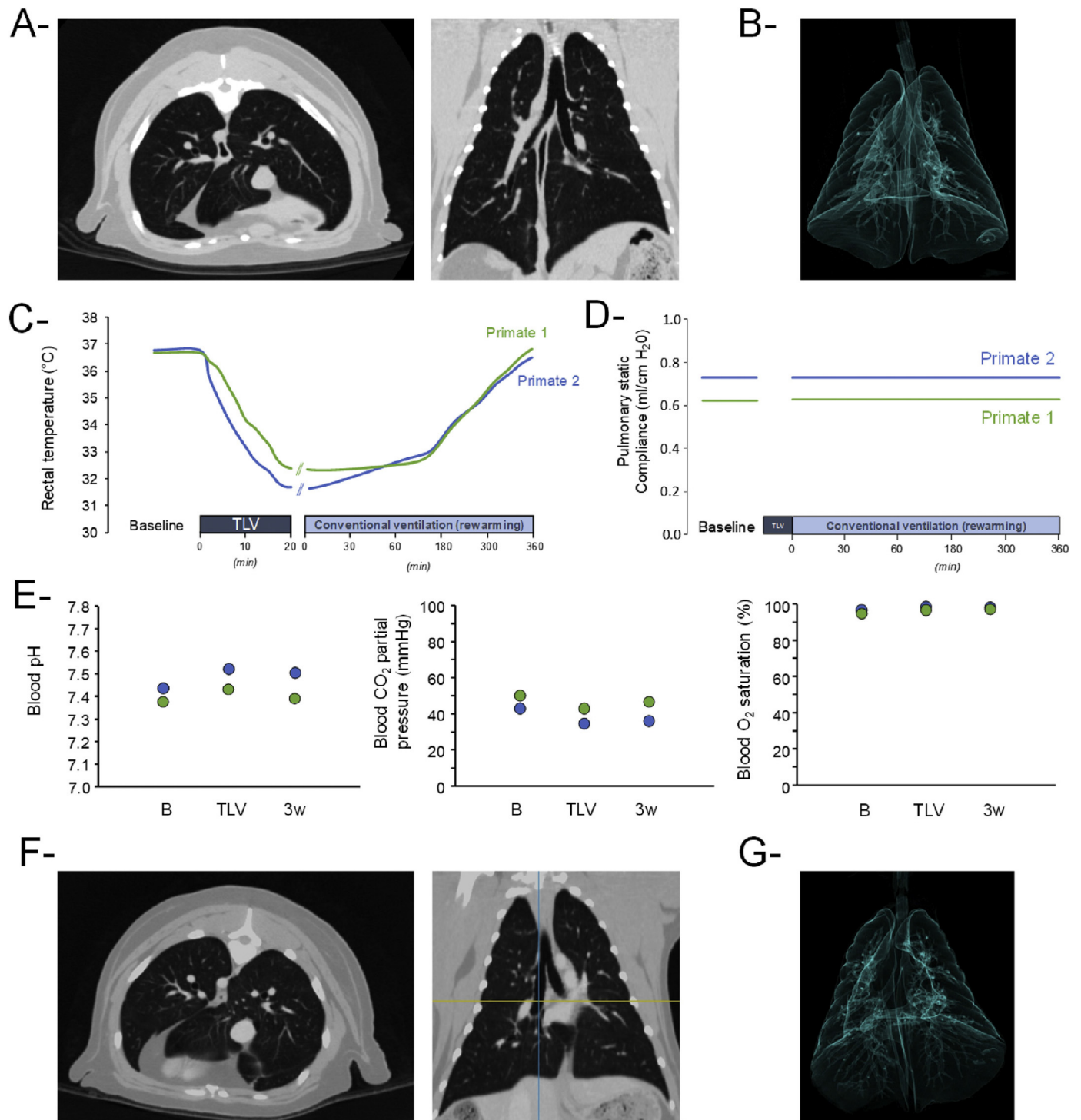


Fig. 7. Evaluation of the long-term tolerance of lung conservative total liquid ventilation (TLV) in two aged non-human primates (*Macaca fascicularis*). A- Transverse images of thoracic computerized tomography (CT-scan) at the initial stage (i.e., two weeks before the TLV episode). B- 3D reconstruction of the lung in the same animal at the initial stage. C- Rectal temperature of the two primates submitted to an episode of hypothermic TLV, followed by rewarming during conventional mechanical ventilation before awakening. D- Pulmonary compliance of the two primates before and after the episode of hypothermic TLV. E- Arterial blood pH, partial pressure of CO₂ and hemoglobin oxygen saturation in the two primates at baseline, during the episode of TLV and 3 weeks later. F- CT-scan four weeks after the TLV episode. G- 3D reconstruction of the lung in the same animal four weeks after the TLV episode.

that such fast cooling with lung-conservative TLV could still be protective in pathophysiological conditions using a piglet model of HIE. This opens promising perspectives for target temperature management in cardiac arrest patients, beyond the other applications of liquid ventilation for lung lavage, drug delivery or lung imaging.

Until now, most reports with TLV were done in animal models of pediatric respiratory diseases with EV and TV averaging 20–30 ml/kg

and 15–30 ml/kg, respectively [10,11,23]. For instance, Tredici et al. induced TLV in rabbits using an initial filling with 20 ml/kg of PFC and TV of 17.5–20 ml/kg [23]. The main rationale was that TLV should completely abolish the air-liquid interface and optimize pulmonary recruitment. However, the long-term pulmonary recovery was rarely evaluated [24] after resumption to spontaneous breathing, which obviously often limited the translation of the results. Here, we

show that such approach could actually be deleterious and that incomplete filling with low EV should be preferred, even if the air-liquid interface is not fully abolished in the initial phase. As illustrated by the pressure-volume relationship, an inflexion point occurs around 40 ml/kg of liquid volume and 15 cmH₂O of alveolar pressure, suggesting that beyond this point, hyperinflation and alveolar overdistension might happen [25]. This could also bring possible explanations for the failure of PLV in patients with acute respiratory distress syndrome [2]. Actually, the previously mentioned pivot trial tested the static intra-tracheal administration of 10 or 20 ml/kg of perflubron during conventional gas ventilation at PEEP = 13 cmH₂O and TV = 8–10 ml/kg [2]. This led to high end-inspiratory alveolar pressure averaging 30 cmH₂O, which is far above the alveolar pressures observed in the present study. This could have led to very high lung volume that completely compromised the putative benefits of PLV. Overall, our finding suggests that the best-tolerated conditions of TLV are associated with a lung filling below FRC, which could be responsible for a certain level of derecruited alveoli in upper pulmonary regions. This alveolar reserve could allow subsequent and safe addition of tidal volume of liquid during liquid ventilation. A certain level of heterogeneity in liquid distribution at expiration could therefore be paradoxically more conservative.

An important finding is also that lung-conservative TLV exerts very fast cooling in both piglets and adult pigs. This is the first study to confirm this finding in animals weighing up to 80 kg, further emphasizing the body-weight independent cooling rate of TLV [19,26]. Such cooling was shown to provide potent neurological benefits after cardiac arrest in adult rabbits. However, we here further show that benefits can also be observed in a neonatal model of cardiac arrest after hypoxic-ischemic encephalopathy. This supports the hypothesis of a very narrow therapeutic window of hypothermia after ischemic injury. In humans treated by therapeutic hypothermia, target temperature is usually achieved after at least 3–4 h of cooling while TLV affords whole-body cooling in <30 min [27,28]. Some techniques were shown to provide rapid regional cooling but TLV is able to cool the entire body rapidly, and not a single body compartment such as the brain with helmets or intra-sinusal cooling [29].

Here, we demonstrate that the rapid achievement of mild hypothermia after resuscitation could be also neuroprotective after neonatal cardiac arrest and hypoxic brain injury. It reinforces previous findings showing the superiority of hypothermic TLV in animal models of adult cardiac arrest as compared to normothermic TLV [14,30]. It also opens promising perspectives for the application of liquid ventilation after delivery in newborns combining severe respiratory distress, meconial aspiration and secondary cardiac arrest. The combined benefit of ultra-fast cooling [14] and lung lavage [10] could lead to potent benefits, as compared to the current management with slow hypothermia and bronchoalveolar lavage with saline. Importantly, the effect of hypothermia may also be mitigated by its duration. Here, TLV was only used for cooling induction and hypothermia was maintained for only 3 h, as compared to 72 h in patients. We are indeed suggesting that early institution after ischemia is sufficient to stop further damages, and thus, longer maintenance of hypothermia might not be necessary. Therefore, these important findings reinforces our previous conclusion in animal models of adult cardiac arrest in rabbits [13,14]. For the latter conditions, we also further show that large animals can be cooled as fast as small animals, allowing to expect similar benefits after resuscitation. Together, these findings support the fact that the clinical translation of TLV could have a maximal benefit-to-risk ratio after pediatric and adult cardiac arrest.

Finally, we also overcame a technological challenge in the present study. For the first time, we developed and used an automatized liquid ventilator able to perform TLV in large animals up to 80 kg. To our knowledge, this is also the first demonstration of the pulmonary consequences of TLV in large animals after resumption to spontaneous breathing. Previous results were observed in dogs with cyclic lung

lavage with PFC [31] but this was not allowing a liquid ventilation with the corresponding myriad of benefits. Here, we also showed that lung-conservative TLV was extremely well tolerated in old non-human primates, ruling out a peculiar sensitivity of the mature primate lungs to liquid filling or to PFC. The latter hypothesis could also have explained the poor tolerance of liquid ventilation in humans in previous clinical trials with PLV [2]. Our results were obtained in 13-years old monkeys, further showing that the good tolerance persisted in mature or aged lungs. Until now, the delayed effect of liquid ventilation after resumption to spontaneous breathing was indeed very poorly evaluated, especially in adult or aged animals as compared to newborn animals. Our findings then makes again TLV a realistic strategy for further applications in humans. At this step, the technology simply needs to be assessed for regulatory purposes before considering a clinical translation.

In conclusion, this study demonstrated that TLV with an accurate and reliable control of lung volumes of perfluorocarbons below FRC could provide the full potential of TLV in a novel and safe manner, despite incomplete initial degassing. This constitutes a paradigm shift through the “tidal” liquid ventilation of partly filled lungs, which strongly differs from the previously known TLV approach, opening promising perspectives for a safe clinical translation.

Funding sources

This study was supported by a Grant from the Agence Nationale pour la Recherche (COOLIVENT), a Grant DBS20140930781 from the « Fondation pour la Recherche Médicale » (FRM) and a Grant (project 273) from SATT IdInnov. The UPSud/CNRS/CEA/SHFJ MRI platform, Orsay, France, was supported by the France Life Imaging network (Grant ANR-11-INBS-0006). The funders did not have any role in study design, data collection, data analysis, interpretation, writing of the report.

Author contributions

Conception and design of the experiments (MK, EB, LDR, AC, JDR, HW, AB, BG, PM, RT); In vivo experiments (MK, EB, FL, AH, JR, NM, RT); Lung pathology (PB); Imaging (LDR, RMD, GG, VP, PP, EB, FL, MK, RT); Liquid ventilator (EFP, MS, MN, PM); Statistical analyses (MK, RT); Data analyses (All authors); Drafting and revision the manuscript (All authors); Approving the final version (All authors).

Declaration of Competing Interest

R Tissier and A Berdeaux are named as inventor on a patent on cooling with liquid ventilation (US20120226337 A1). P Micheau, M Nadeau and H Walti declares owning patents on liquid ventilation (US Patents # 7,726,311; Preliminary US patent 61/838,896). A Berdeaux, M Kohlhauer, H Walti, M Nadeau, P Micheau and R Tissier are shareholders of a start-up company dedicated to the clinical research on total liquid ventilation (Orixha).

Acknowledgments

The authors are greatly indebted to Estelle Chavret-Reculon, Morgane Weissenburger and Magali Dumont for their exceptional support to the non-human primate experiments. The core for the latter experiments is supported by 2 “Investissements d’avenir” (ANR-10-IAIHU-06 and ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS) and the “DIM-NeRF Ile de France”.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.08.026>.

References

- [1] Wolfson MR, Shaffer TH. Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: ventilation and beyond. *Paediatr Respir Rev* 2005;6:117–27.
- [2] Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT, Wedel MK, Tutuncu AS, Slutsky AS. Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:882–9.
- [3] Fujino Y, Goddon S, Chiche JD, Hromi J, Kacmarek RM. Partial liquid ventilation ventilates better than gas ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:650–7.
- [4] Goikoeitia E, Murgia X, Serna-Grande P, Rivas A, et al. In vitro surfactant and perfluorocarbon aerosol deposition in a neonatal physical model of the upper conducting airways. *PLoS One* 2014;9:e106835.
- [5] Aramendia I, Fernandez-Gamiz U, Lopez-Ariza A, et al. Experimental evaluation of perfluorocarbon aerosol generation with two novel nebulizer prototypes. *Pharmaceutics* 2019;11:19.
- [6] Jahr JS, Guinn NR, Lowery DR, Shore-Lesserson L, Shander A. Blood substitutes and oxygen therapeutics: a review. *Anesth Analg* 2019 [In press]. doi: 10.1213/ANE.0000000000003957.
- [7] Chapelin F, Capitini CM, Ahrens ET. Fluorine-19 MRI for detection and quantification of immune cell therapy for cancer. *J Immunother Cancer* 2018;6:105.
- [8] Li X, Sui Z, Li X, et al. Perfluorooctylbromide nanoparticles for ultrasound imaging and drug delivery. *Int J Nanomedicine* 2018;13:3053–67.
- [9] Clark Jr. LC, Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 1966;152:1755–6.
- [10] Avoine O, Bossé D, Beaudry B, et al. Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome. *Crit Care Med* 2011;39:1097–103.
- [11] Wolfson MR, Hirschl RB, Jackson JC, et al. Multicenter comparative study of conventional mechanical gas ventilation to tidal liquid ventilation in oleic acid injured sheep. *ASAIO J* 2008;54:256–69.
- [12] Hirschl RB, Merz SI, Montoya JP, et al. Development and application of a simplified liquid ventilator. *Crit Care Med* 1995;23:157–63.
- [13] Kohlhauser M, Lidouren F, Remy-Jouet I, Mongardon N, Adam C, Bruneval P, et al. Hypothermic total liquid ventilation is highly protective through cerebral hemodynamic preservation and sepsis-like mitigation after asphyxial cardiac arrest. *Crit Care Med* 2015;43:e420–30.
- [14] Chenoune M, Lidouren F, Adam C, et al. Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in rabbits. *Circulation* 2011;124(1–7):901–11.
- [15] Shaffer TH, Forman DL, Wolfson MR. Physiological effects of ventilation with liquid fluorocarbon at controlled temperatures. *Undersea Biomed Res* 1984;11:287–98.
- [16] Nadeau M, Sage M, Kohlhauser M, et al. Optimal control of inspired perfluorocarbon temperature for ultrafast hypothermia induction by total liquid ventilation in an adult patient model. *IEEE Trans Biomed Eng* 2017;2760–70.
- [17] Costantino ML, Micheau P, Shaffer TH, Tredici S, Wolfson MR. Clinical design functions: round table discussions on the bioengineering of liquid ventilators. *ASAIO J* 2009;55:206–8.
- [18] Robert R, Micheau P, Cyr S, Lesur O, Praud JP, Walti H. A prototype of volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps. *ASAIO J* 2006;52:638–45.
- [19] Nadeau M, Micheau P, Robert R, et al. Core body temperature control by total liquid ventilation using a virtual lung temperature sensor. *IEEE Trans Biomed Eng* 2014;61:2859–68.
- [20] Yüksel B, Greenough A. Functional residual capacity to thoracic gas volume (FRC:TGV) ratio in healthy neonates. *Respir Med* 1995;89:429–33.
- [21] Chenoune M, De Rochefort L, Bruneval P, et al. Evaluation of lung recovery after static administration of three different perfluorocarbons in pigs. *BMC Pharmacol Toxicol* 2014;15:53.
- [22] Miller TF, Milestone B, Stern R, Shaffer TH, Wolfson MR. Effects of perfluorochemical distribution and elimination dynamics on cardiopulmonary function. *J Appl Physiol* 2001;90:839–49.
- [23] Tredici S, Komori E, Funakubo A, et al. A prototype of a liquid ventilator using a novel hollow-fiber oxygenator in a rabbit model. *Crit Care Med* 2004;32:2104–9.
- [24] Jackson JC, Standaert TA, Truog WE, Hodson WA. Full-tidal liquid ventilation with perfluorocarbon for prevention of lung injury in newborn non-human primates. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22:1121–32.
- [25] Hickling KG. The pressure-volume curve is greatly modified by recruitment. A mathematical model of ARDS lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158:194–202.
- [26] Nadeau M, Sage M, Praud J-P, Tissier R, Walti H, Micheau P. Optimal control of inspired perfluorocarbon temperature for induction of hypothermia by total liquid ventilation in juvenile lamb model. *Proc Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc EMBS* 2016;2016:2704–7.
- [27] Polderman KH, Varon J. How low should we go?: hypothermia or strict normothermia after cardiac arrest? *Circulation* 2015;131:669–75.
- [28] Sonder P, Janssens GN, Beishuizen A, Henry CL, Rittenberger JC, Callaway CW, et al. Efficacy of different cooling technologies for therapeutic temperature management: a prospective intervention study. *Resuscitation* 2018;124:14–20.
- [29] Castren M, Nordberg P, Svensson L, Taccone F, Vincent JL, Desruelles D, et al. Intra-arrest transnasal evaporative cooling: a randomized, prehospital, multicenter study (PRINCE: pre-ROSC IntraNasal cooling effectiveness). *Circulation* 2010;122:729–36.
- [30] Darbera L, Chenoune M, Lidouren F, Kohlhauser M, Adam C, Bruneval P, et al. Hypothermic liquid ventilation prevents early hemodynamic dysfunction and cardiovascular mortality after coronary artery occlusion complicated by cardiac arrest in rabbits. *Crit Care Med* 2013;41:e457–65.
- [31] Harris SB, Darwin MG, Russell SR, O'Farrell JM, Fletcher M, Wovk B. Rapid (0.5 °C/min) minimally invasive induction of hypothermia using cold perfluorochemical lung lavage in dogs. *Resuscitation* 2001;50:189–204.
- [32] Cutillo AG, Ailion DC. Modeling the nuclear magnetic resonance behavior of lung: from electrical engineering to critical care medicine. *Bioelectromagnetics* 1999 (Suppl. 4):110–9.

B. Étude des effet de la ventilation liquide totale hypothermisante sur la réponse inflammatoire post-arrêt cardiaque

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

Ultra-fast hypothermia selectively mitigates the early humoral response after cardiac arrest.

Boissady E., Kohlhauer M., Lidouren F., Hocini H., Tchitchek N., Deye N., Cariou A., Micheau P., Ghaleh B., Tissier R.

1 Introduction

Si l'hypothermie est à l'origine de puissants effets protecteurs en condition expérimentale, son efficacité semble diminuer à mesure que son induction est retardée après l'arrêt cardiaque. Ainsi plusieurs études suggèrent que la fenêtre d'efficacité optimale de l'hypothermie est comprise entre 2 et 4 h après l'arrêt cardiaque [296, 171, 198, 199]. Cependant les mécanismes conditionnant l'étroitesse de cette fenêtre sont encore relativement méconnus. Afin de définir plus précisément les conditions du transfert clinique de la VLT, il apparait essentiel d'améliorer la compréhension de ses mécanismes. Une étude antérieure du laboratoire a déjà montré que la VLT agissait en partie en protégeant la BHE des dommages induits par l'arrêt cardiaque [10]. Dans un modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez des lapins, l'hypothermie appliquée de façon ultra-rapide par VLT permettait en effet de prévenir l'ouverture de la BHE et la fuite de protéines plasmatiques, observée durant les 2 premières heures suivant la RACS chez les animaux témoins. Cet effet pourrait notamment contribuer à diminuer la neuro-inflammation et ses conséquences sur la mortalité neuronale retardée. Comme évoqué précédemment, l'arrêt cardiaque est en effet à l'origine d'une forte stimulation immunitaire et d'une réponse inflammatoire similaire à celle observée au décours du choc septique. Il a été montré que cette réponse contribuait à assombrir le pronostic neurologique des patients [74]. Par ailleurs, des événements décisifs semblent avoir lieu très précocement au cours de cette réponse et conditionnent le pronostic à long terme chez l'homme. D'autres travaux menés par le laboratoire ont en effet montré que des patients ayant survécu avec une bonne récupération neurologique après un arrêt cardiaque présentaient une signature transcriptomique différente de celle des patients présentés des séquelles neurologiques modérées à sévères. Cette signature, identifiable dès les premières heures suivant la réanimation, impliquait notamment une activation différentielle des voies canoniques de l'immunité innée et de l'inflammation [297].

L'objectif de ce travail était donc d'évaluer l'effet de l'hypothermie ultra-rapide par VLT sur la réponse inflammatoire au décours d'un arrêt cardiaque, en étudiant plus particulièrement son effet sur les éléments initiateurs de cette réponse. Nous avons notamment choisi de documenter l'effet de l'hypothermie sur la libération d'un DAMP, jouant un rôle central dans la propagation des lésions d'ischémie-reperfusion, HMGB1. Pour cela, nous avons

effectué un suivi de la réponse humorale et cellulaire dans un modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez le lapin. Afin de confirmer le lien entre la réponse humorale précoce et le pronostic final chez l'homme, cette étude a été complétée par une analyse rétrospective des données de transcriptomique issues d'un essai clinique (EPO-ACR02). Nous avons ainsi pu comparer l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires à différents temps après l'arrêt cardiaque chez des patients réanimés à la suite d'un arrêt cardiaque extrahospitalier.

2 Protocole expérimental

Étude de survie, pronostic neurologique et de la réponse inflammatoire

Les animaux ont été soumis à un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire et à une RCP, comme décrit précédemment. Après la RACS, les lapins ont été répartis aléatoirement en deux groupes distincts qui ont été suivis pendant 7 h avec une administration continue d'adrénaline, si nécessaire, et une ventilation mécanique conventionnelle (VMC). D'autres animaux ont été soumis à une procédure Sham et ont été anesthésiés et ventilés selon les mêmes modalités, sans induction préalable d'un arrêt cardiaque. Le groupe Témoin a fait l'objet d'un contrôle normothermique strict après la RCP. Le groupe VLT a été soumis à une procédure de VLT hypothermisante 15 min après la RCP. L'hypothermie a été maintenue pendant 3 h et les animaux ont été réchauffés à raison de 1°C/h (Figure 42). Ils ont ensuite été sevrés de la ventilation mécanique et réveillés. Les animaux ont été suivis pendant 3 jours pour l'évaluation de la fonction neurologique. A l'issue de cette période, les animaux ont été euthanasiés et leur cerveau prélevé pour la réalisation d'analyses histologiques. Des prélèvements sanguins ont été effectués tout au long du suivi des animaux pour évaluer les concentrations de plusieurs cytokines ainsi que la population des leucocytes périphériques, selon la méthode décrite précédemment.

Étude *in vitro*: épreuve de stimulation des cellules sanguines avec du LPS

Afin d'évaluer l'effet intrinsèque de l'hypothermie sur la réactivité des leucocytes sanguins, des analyses *in vitro* sur sang total ont été réalisées. Du sang a été prélevé sur des lapins naïfs, et les échantillons ont été stimulés avec du LPS puis incubés à 33°C ou à 38°C selon les modalités décrites précédemment. Les concentrations en IL-6, IL-1 β et TNF- α ont été ensuite évaluées.

Analyse des données de patients issues de l'essai clinique EPO-ACR02

En complément des études expérimentales sur lapin, nous avons utilisé des données préalables disponibles concernant les profils d'expression cytokinique de patients réanimés au décours d'un arrêt cardiaque extrahospitalier, afin de valider la pertinence clinique de nos observations sur la réponse inflammatoire précoce. Ces données sont issues d'une étude ancillaire impliquant 69 patients inclus dans un essai thérapeutique de plus grande

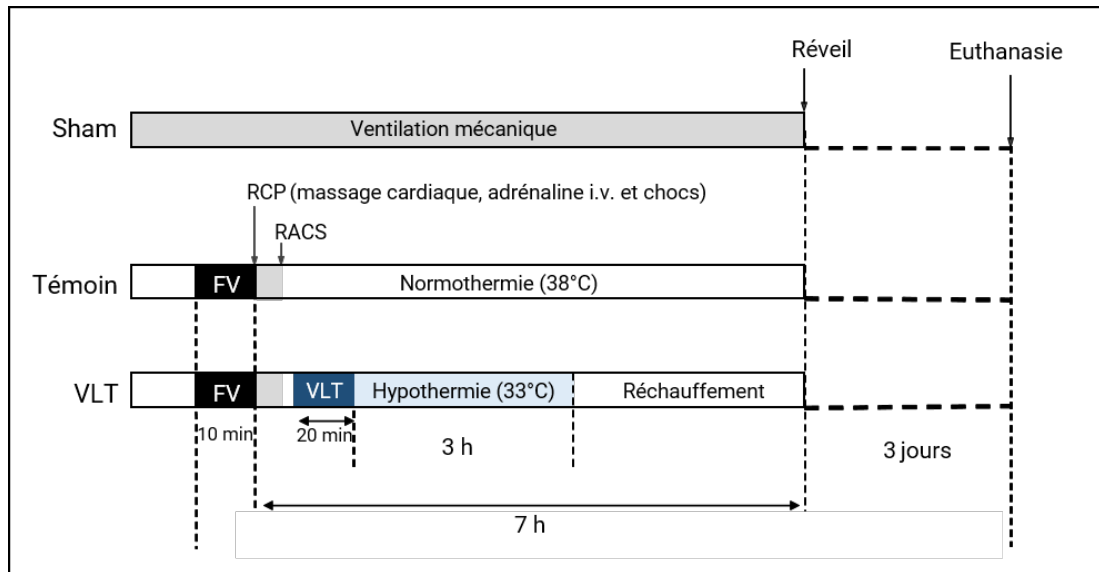


Figure 42: Protocole expérimental.

RACS, reprise d'une activité circulatoire spontanée ; RCP, réanimation cardio-pulmonaire ; FV, fibrillation ventriculaire ; VLT, ventilation liquide totale

envergure sur l'effet de l'érythropoïétine en post-arrêt cardiaque (Essai EPO-ACR2) [298]. Dans l'étude correspondante, des échantillons de sang ont été prélevés chez les patients lors de leur admission à l'hôpital, puis 24 et 72 h plus tard (le temps de prélèvement exact était systématiquement enregistré) afin d'analyser l'évolution de leur transcriptome par une puce spécifique (34 000 gènes, Illumina HumanHT-12 V4 BeadChip) [297]. Les patients ont été divisés en deux groupes sur la base de leur fonction neurologique 60 jours après l'arrêt cardiaque, de manière à distinguer les patients avec évolution neurologique favorable (catégorie de performance cérébrale [CPC]=1-2) des patients avec un pronostic défavorable (CPC > 2).

Parmi ces données, nous avons extrait de façon ciblée les données relatives à certaines cytokines d'intérêt, que nous avons également dosées chez nos animaux, soit l'IL-6, le TNF- α et l'IL-1 β . Nous avons comparé leurs niveaux d'expression entre les deux catégories de patients. Cette comparaison a été effectuée à des temps précoces (échantillons prélevés au cours des 8 premières heures suivant la réanimation, n=25 vs n=33 dans les groupes des patients avec bon vs mauvais pronostic) puis répétée à des temps plus tardifs (i.e., entre 8 et 36 h après la réanimation, n=28 vs n=35 dans les groupes à bon vs mauvais pronostic).

3 Résultats

Effectifs, évolution des températures et paramètres hémodynamiques

Trente-quatre animaux ont été soumis à un arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire. Parmi ces animaux, 12 lapins ont pu être réanimés avec succès et inclus dans les différents groupes expérimentaux, à raison de 6 lapins par groupe. Les temps moyens de réanimation étaient respectivement de $3,9 \pm 1,2$ et $2,9 \pm 0,7$ min dans les groupes Témoin et VLT, respectivement. Par ailleurs, 7 animaux ont été soumis à la procédure Sham. Comme illustré par

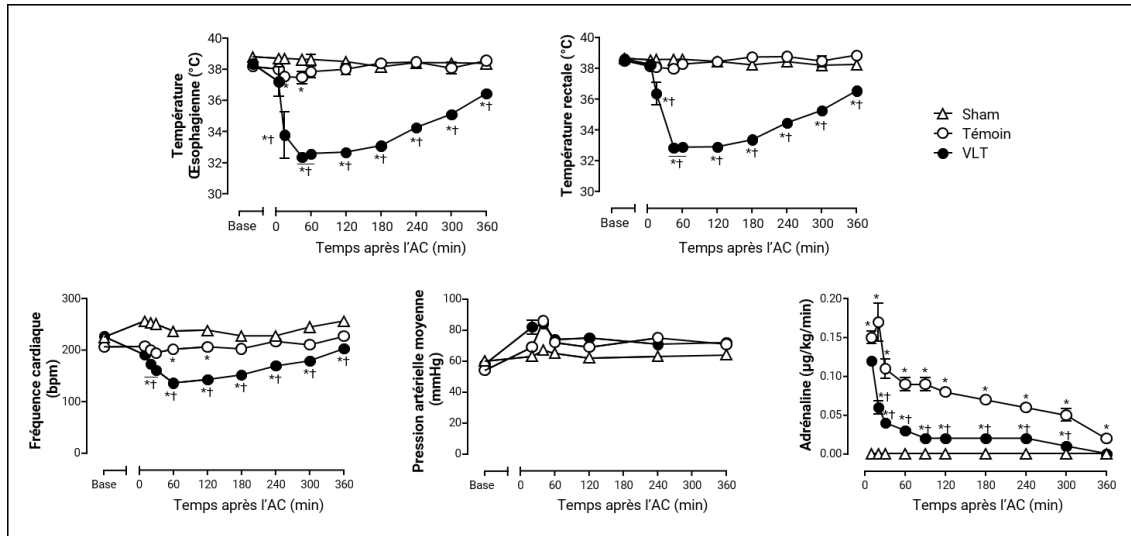


Figure 43: Évolution des températures corporelles et des paramètres hémodynamiques au cours du suivi.

*AC, arrêt cardiaque; VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin*

la Figure 43, la VLT hypothermisante a permis de refroidir très rapidement les animaux du groupe VLT. La température a été abaissée à 33°C en environ 10 min dans l'œsophage et en moins de 30 min dans le rectum. En revanche, dans le groupe témoin, la température a été maintenue à $38 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ tout au long de la procédure.

Au décours de l'arrêt cardiaque, les valeurs de la pression artérielle moyenne étaient similaires entre les groupes. Les animaux du groupe VLT ont cependant présenté une fréquence cardiaque significativement plus basse au cours de l'hypothermie. De même, ces animaux ont nécessité des quantités plus faibles d'adrénaline que le groupe Témoin pour maintenir une pression artérielle moyenne à 70 mmHg. Ainsi, les animaux du groupe VLT ont reçu $139 \pm 17 \mu\text{g}/\text{kg}$ d'adrénaline au cours du suivi contre $426 \pm 76 \mu\text{g}/\text{kg}$ dans le groupe Témoin.

Mortalité cellulaire précoce

Afin de documenter la mortalité cellulaire précoce consécutive à l'ischémie-reperfusion généralisée, les concentrations en HMGB1 et en PS100B ont été mesurées dans le sang des animaux avant et après l'arrêt cardiaque. Sur la base de ces biomarqueurs, il semble que la VLT ne modifie pas l'intensité des dommages cellulaires qui ont lieu immédiatement après l'arrêt cardiaque. En effet, comme illustré par la Figure 44, les niveaux plasmatiques en HMGB1 ont rapidement augmenté après la RACS dans les groupes Témoin et VLT mais aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les deux groupes. Par exemple, la concentration moyenne était de $35 \pm 13 \text{ ng}/\text{ml}$ dans le groupe VLT 30 min après la RACS, par rapport à $30 \pm 7 \text{ ng}/\text{ml}$ dans le groupe témoin et $10 \pm 0,1 \text{ ng}/\text{ml}$ dans le groupe Sham. De même, la VLT n'a pas montré d'effet sur l'élévation de la concentration en PS100B au cours des premières heures suivant la RACS. Ainsi 3 h après la réanimation, les niveaux de PS100B ont augmenté de respectivement $124 \pm 62\%$ et $92 \pm 37\%$ dans les groupes VLT et Témoin par rapport aux concentrations initiales (1165 ± 310 et $1080 \pm 181 \text{ pg}/\text{ml}$).

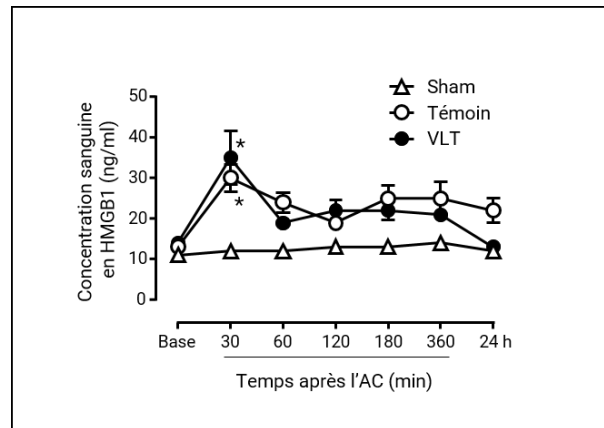


Figure 44: Évolution des concentrations sanguines en HMGB1 dans les différents groupes. AC, arrêt cardiaque; VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham

Pronostic neurologique et histologie cérébrale

La VLT hypothermisante s'est accompagnée d'une amélioration significative de la fonction neurologique après l'arrêt cardiaque. La Figure 45 illustre les scores de dysfonction neurologique individuels chez les lapins des différents groupes. Le groupe VLT présentait un score de dysfonction neurologique moyen de 34% le lendemain de l'arrêt cardiaque contre 66% dans le groupe témoin. À la fin de l'étude, les animaux témoins présentaient une dysfonction neurologique de 100%, du fait de la mortalité dans ce groupe, alors qu'elle était de $11 \pm 4\%$ dans le groupe VLT. L'ensemble des lapins du groupe Témoin a en effet dû être euthanasié prématurément avant la fin des 3 jours de suivi en accord avec les points limites préalablement définis (dysfonction $> 60\%$ persistante). Une moindre mortalité neuronale tardive a également été objectivée dans le groupe VLT par rapport au groupe Témoin à l'examen histologique. Comme illustré par la Figure 45, les animaux soumis à une VLT hypothermisante présentaient moins de neurones positifs au Fluorojade C (20 ± 12 et 5 ± 2 /champ), par rapport au groupe témoin (43 ± 12 et 21 ± 8 /champs), dans le cortex et l'hippocampe.

Par ailleurs des marquages immunohistochimiques réalisés sur les cerveaux de ces mêmes animaux au terme de la période de suivi ont révélé une augmentation de la concentration intra-tissulaire en leucocytes d'origine périphérique dans le groupe Témoin par rapport au groupe Sham (Figure 46). Cette infiltration cérébrale par les leucocytes périphérique était significativement diminuée chez les animaux traités par VLT.

Réponse inflammatoire aiguë

Comme l'illustre la Figure 47, malgré l'absence d'effet sur la mort cellulaire et la libération de signaux pro-inflammatoires, la VLT hypothermisante a entraîné une modification de la réponse immunitaire humorale précocement après l'arrêt cardiaque. Dans le groupe Témoin, l'arrêt cardiaque était associé à une réponse pro-inflammatoire caractérisée par une élévation rapide des concentrations sanguines en IL-6, sans modification des niveaux de

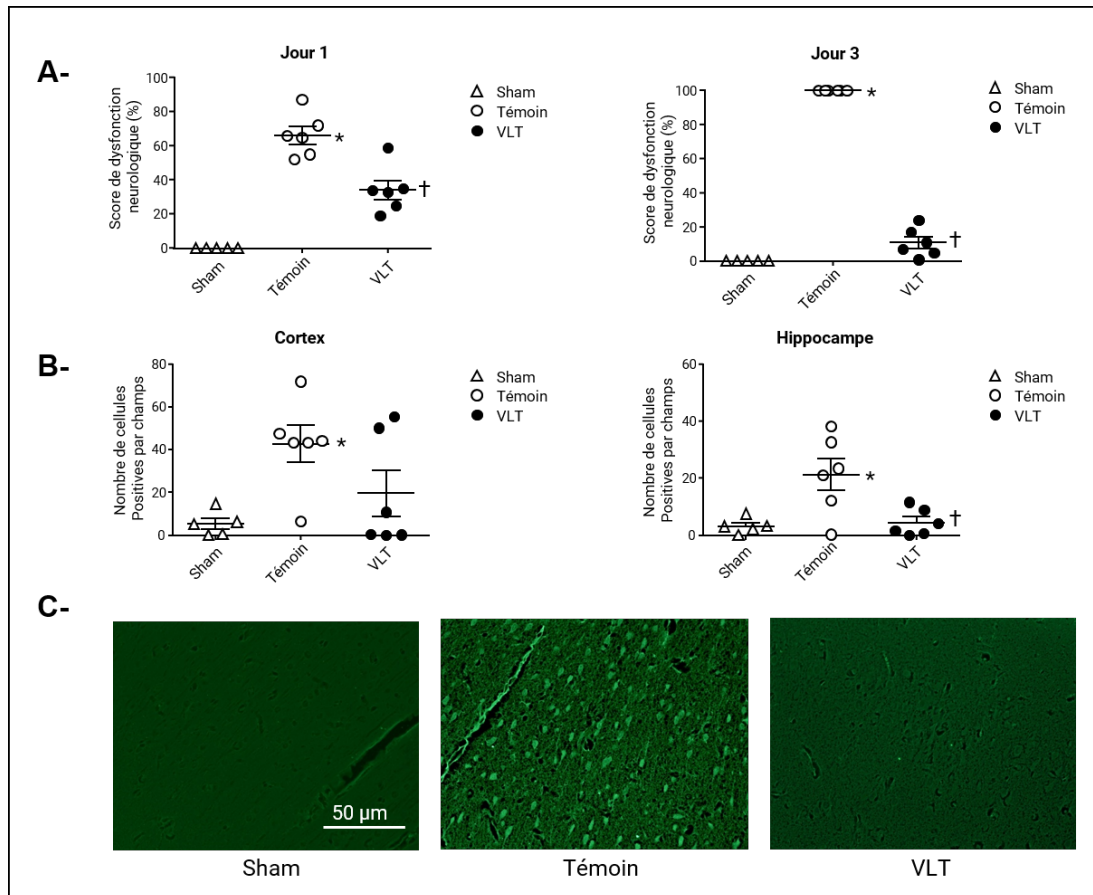


Figure 45: Score neurologiques mesurés au premier et au dernier jour de suivi après l'arrêt cardiaque(A). Les cercles représentent les scores individuels et les traits représentent la moyenne de chaque groupe. Nombre moyen de neurones dégénérésents dans le cortex et l'hippocampe, correspondant au nombre moyen de neurones positifs au fluorojade C par champ analysé (B). Les cercles représentent les moyennes individuelles et les traits la médiane de chaque groupe. Aspect histologique d'une zone représentative de l'hippocampe colorée au fluorojade C dans les différents groupes expérimentaux (C). Trait = 100 μm .

VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoïn

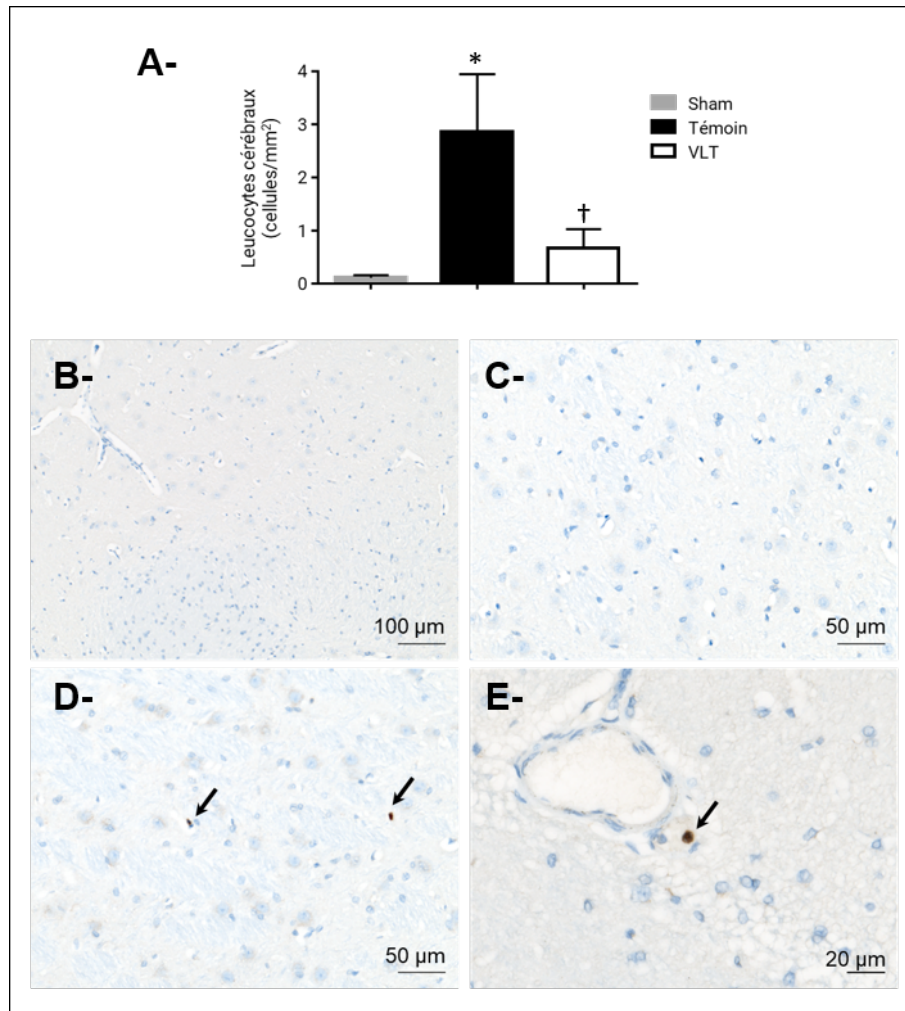


Figure 46: Infiltration du parenchyme cérébral par les leucocytes d'origine circulante. Nombre de leucocytes (lymphocytes et neutrophiles) localisés dans le parenchyme cérébral dans les différents groupes expérimentaux (A). Aspect histologique du marquage immuno-histochimique utilisé pour le dénombrement des leucocytes, (B-E). Les animaux Sham ne présentaient quasiment pas de cellules positives (B,C). Dans les groupes Témoin et VLT, des leucocytes intra-tissulaires épars (flèches noires) généralement localisés à proximité de vaisseaux étaient identifiés (D,E).

VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

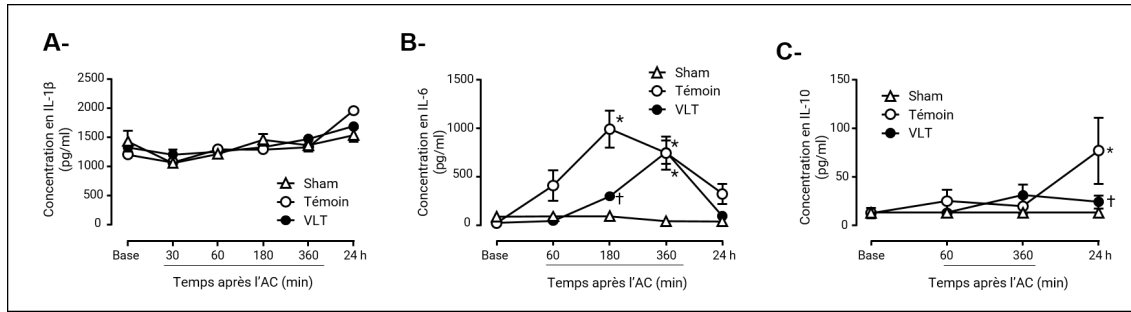


Figure 47: Évolution des concentrations en IL-1 β (A), IL-6 (B) et TNF- α (C) au cours du suivi dans les différents groupes expérimentaux.

AC, arrêt cardiaque; VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin.

TNF- α et d'IL-1 β (concentrations sous la limite de quantification durant toute la procédure) par rapport aux animaux du groupe Sham (Figure 47). Le pic de concentration en IL-6 a été observé chez les animaux Témoins 3 h après l'arrêt, puis les concentrations ont progressivement diminué jusqu'à retrouver une valeur similaire à celle du groupe Sham à partir de 24 h après l'arrêt cardiaque. Dans le groupe VLT, la concentration en IL-6 était significativement abaissée 3 h après l'arrêt cardiaque avec une valeur moyenne divisée par 3 par rapport au groupe Témoin. Ce n'était plus le cas après le réchauffement des animaux, c'est-à-dire 6 h après l'arrêt cardiaque.

Une élévation des concentrations sanguines de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 a également été mise en évidence chez les animaux du groupe Témoin, 24 h après l'arrêt cardiaque. Cette réponse, correspondant probablement à un rétrocontrôle du syndrome pro-inflammatoire précoce, était aussi atténuée dans le groupe VLT.

Ces données suggèrent que l'induction très précoce d'une hypothermie après l'arrêt cardiaque permet de limiter la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires. Cet effet était en partie perdu au cours du réchauffement, mais il semble exister une fenêtre de susceptibilité particulière vis-à-vis des événements inflammatoires au cours des 6 premières heures suivant la réanimation.

Comme illustré par la Figure 48, l'hypothermie induite par VLT était sans effet sur le recrutement des cellules immunitaires dans la circulation sanguine. Une leucocytose modérée a été observée dans les groupes VLT et Témoin à partir de 3 h post-arrêt cardiaque. Elle était essentiellement attribuable à une augmentation de la quantité des granulocytes (augmentation de $135 \pm 31\%$ et $131 \pm 56\%$, respectivement dans les groupes Témoin et VLT par rapport aux valeurs pré-arrêt). Elle s'accompagnait également d'une diminution du nombre de lymphocytes, affectant uniformément toutes les sous-populations lymphocytaires (lymphocytes TCD4, TCD8 et B). L'effet de l'hypothermie sur la réponse humorale n'était donc *a priori* pas médié par une inhibition de la mobilisation des leucocytes.

Modulation de la réactivité leucocytaire par la température

Afin de confirmer l'effet propre de l'hypothermie sur l'activité sécrétoire des cellules

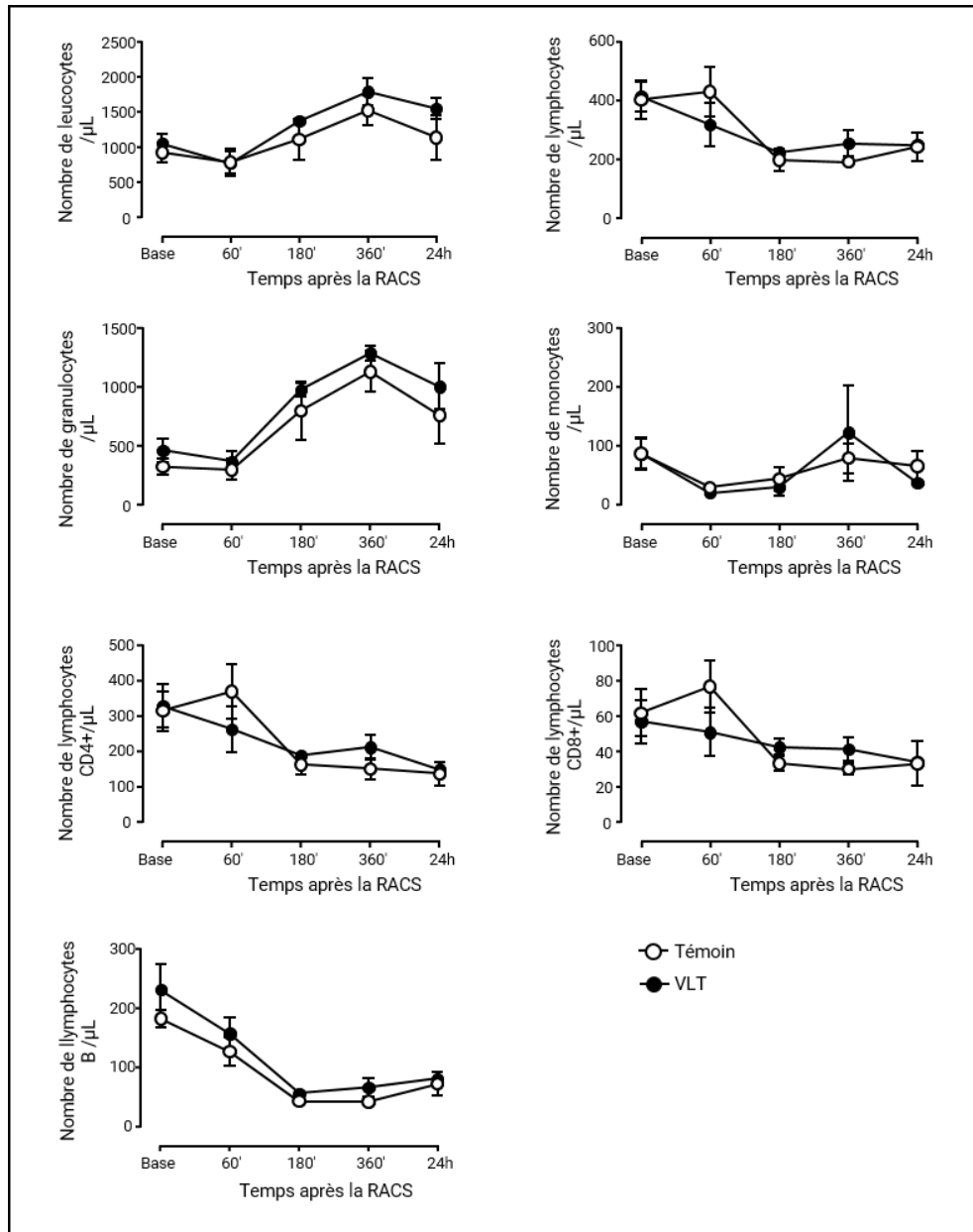


Figure 48: Numérations leucocytaires dans la circulation sanguine au cours du suivi. Les granulocytes ont été identifiés par un marquage CD11⁺CD14⁻, les monocytes par un marquage CD11⁺CD14⁺ et les lymphocytes B comme des cellules CD79a⁺. Les lymphocytes T ont été identifiés grâce à un marqueur dédié, puis classifiés en CD4⁺ ou CD8⁺. AC, arrêt cardiaque; VLT, ventilation liquide totale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

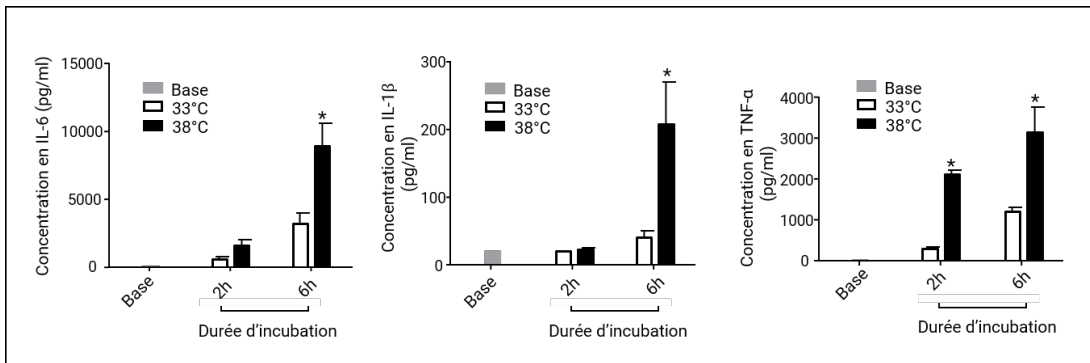


Figure 49: Concentrations en interleukine (IL)-6, IL-1 β et tumor necrosis factor (TNF)- α dans du sang de lapin avant (base) et après incubation in vitro avec du LPS à 33 ou 38°C.

***, $p < 0,05$ par rapport à 33°C

immunitaires, nous avons évalué la production en IL-6, IL-1 β et TNF- α de cellules sanguines incubées à 33°C ou 38°C en réponse à un stimulus pro-inflammatoire. Les concentrations de toutes les cytokines étaient augmentées dès 2 h après l'ajout de LPS dans tous les échantillons par rapport aux valeurs basales (i.e., avant la stimulation) (Figure 49). Néanmoins, les échantillons incubés à 33°C présentaient des concentrations significativement inférieures à celles des échantillons incubés à 38°C dès 2 h pour le TNF- α et à partir de 6 h d'incubation pour l'IL-6 et l'IL-1 β . Les quantités d'IL-6 étaient par exemple ainsi divisées par 3 lorsque les échantillons étaient incubés à 33°C par rapport à 38°C.

Validation du rôle des événements inflammatoires précoces chez l'homme

Nous avons évalué l'importance de la réponse inflammatoire précoce chez l'homme en comparant les taux d'ARNm des IL-6, IL-1 β et du TNF- α entre des patients ayant présenté une évolution neurologique favorable vs défavorable (CPC1-2 vs CPC>2), tout d'abord sur des échantillons prélevés au cours de la phase précoce du syndrome post-arrêt cardiaque (< 8 h après la réanimation), puis sur des échantillons prélevés plus tardivement (entre 8 et 36 h après la réanimation). Comme illustré par la Figure 50, le niveau d'expression de l'IL-6 dans les 8 premières heures après l'arrêt cardiaque était significativement plus élevé dans le groupe des patients avec un mauvais pronostic neurologique. Toutefois la corrélation positive entre les niveaux de transcription de l'IL-6 et la récupération neurologique des patients n'était plus observée au-delà de 8 h. Il n'existait pas de différence significative entre les deux groupes de patients concernant les niveaux d'expression de l'IL-1 β et du TNF- α , quel que soit le moment de prélèvement. Ces résultats suggèrent que l'IL-6 produit précocement après l'arrêt cardiaque joue un rôle particulier dans la neuropathogénèse.

4 Commentaires

Dans cette étude nous avons montré que l'hypothermie induite rapidement après la RACS par VLT exerçait bien des effets inhibiteurs sur le syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque. Cette activité anti-inflammatoire ne semble pas médiée par la protection vis-à-vis

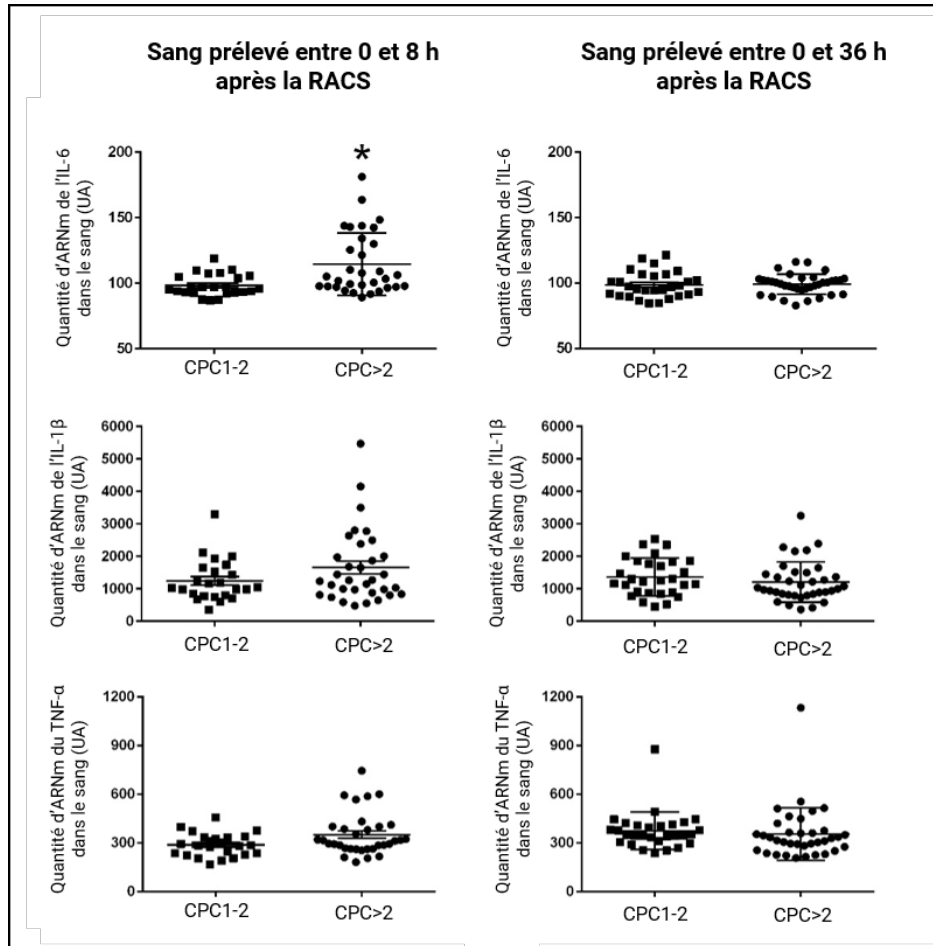


Figure 50: Niveaux de transcription sanguine de l'IL-6 chez des patients, entre 0 et 8 h après un arrêt cardiaque extrahospitalier, puis entre 8 et 36 h après (n=58 et 73, respectivement). Ces niveaux ont été comparés entre des patients avec une bonne (CPC=1-2) vs une mauvaise récupération neurologique (CPC>2). Les cercles représentent les valeurs individuelles et les lignes horizontales la moyenne du groupe.

RACS, reprise d'une activité circulatoire spontanée; *CPC*, catégorie de performance cérébrale; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe CPC 1-2

de la mortalité cellulaire précoce et la libération de DAMPs, comme en témoigne l'évolution des concentrations en HMGB1 et en PS100B dans les premières heures suivant l'arrêt cardiaque. Nous avons principalement observé une inhibition de la réponse humorale, *a priori* médiée par une action directe de l'hypothermie sur la réactivité des cellules immunitaires périphériques, sans modification de leur recrutement dans la circulation. Ainsi, il semble que l'effet neuroprotecteur de la VLT puisse être en partie attribuable à un découplage entre les signaux pro-inflammatoires initiaux et leurs conséquences tardives, i.e., la propagation des lésions cérébrales.

Dans notre étude, l'hypothermie était initiée très précocement après l'arrêt cardiaque. La température cible était atteinte dans les 30 min suivant la RACS. Or, même dans ces conditions, elle ne permettait pas de prévenir les lésions primaires d'ischémie-reperfusion. Il semble donc que ces lésions résultent majoritairement de processus irréversibles initiés durant l'ischémie et immédiatement après la RACS, et ne constituent pas une cible pertinente pour l'hypothermie telle qu'elle pourrait être pratiquée en clinique. Néanmoins, la VLT était tout de même à l'origine d'une réduction des lésions cérébrales tardives, comme le montre la diminution du nombre de neurones marqués au fluorojade C dans le groupe VLT. Cet effet était associé à une baisse des niveaux plasmatiques de l'IL-6. Une partie des effets neuroprotecteurs pourrait donc provenir de l'atténuation précoce de la réponse humorale induite par l'arrêt cardiaque.

Si le rôle causal de l'inflammation dans le développement des séquelles neurologiques n'a pas été confirmé dans notre étude, ce qui constitue une de ses principales limites, plusieurs mécanismes d'action de l'IL-6 seraient susceptibles de contribuer directement à la physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque. Par exemple, il a été montré que l'IL-6, en stimulant l'expression des protéines constitutives des jonctions serrées, contribue à perméabiliser la BHE [299] et favorise ainsi l'entrée des cellules immunitaires périphériques dans le parenchyme cérébral [300]. De plus, des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la BHE était préservée chez les animaux traités par VLT immédiatement après la réanimation [10]. Il pourrait s'agir d'une conséquence directe de la réduction des concentrations circulantes en IL-6. Il serait intéressant de valider par des analyses complémentaires que la VLT s'accompagne également d'une inhibition de l'infiltration des leucocytes sanguins dans le cerveau. Par ailleurs, l'IL-6 est une cytokine activatrice de la coagulation et est ainsi impliquée dans les thromboses microvasculaires [257]. Elle pourrait donc de surcroît aggraver les phénomènes de *no-reflow* après l'arrêt cardiaque.

Toutefois, de façon inattendue, nous avons observé une augmentation des concentrations en IL-6 au cours de la période de réchauffement dans le groupe VLT. Les animaux de ce groupe présentaient ainsi de nouveau des concentrations similaires à celles des animaux non refroidis 6 h après l'arrêt cardiaque. Une inhibition transitoire d'une partie de la réponse inflammatoire durant une période de susceptibilité particulière pourrait donc être suffisante pour protéger les animaux sur le long terme. L'importance des événements inflammatoires précoces est d'ailleurs corroborée dans notre étude par l'association entre les niveaux d'expression de l'IL-6 et la fonction neurologique des patients 60 jours après l'arrêt cardiaque, uniquement dans les premières heures suivant la réanimation.

Un autre résultat intéressant concerne l'inhibition de la réponse anti-inflammatoire compensatrice. Nous avons en effet mis en évidence une baisse de la concentration en IL-10 24 h après l'arrêt cardiaque chez les animaux du groupe VLT. Il s'agit d'une réponse secondaire communément observée chez les patients après un arrêt cardiaque, supposée contrebalancer l'activation excessive des voies pro-inflammatoires. Elle est similaire à l'état de tolérance endotoxinique secondaire qui peut être observé lors de choc septique et aggrave également la sensibilité des patients aux infections nosocomiales [301]. En diminuant l'intensité de la réponse pro-inflammatoire, l'hypothermie précoce pourrait donc contribuer à maintenir l'équilibre immunologique global des patients. Enfin, dans notre étude, le profil cytokinique des animaux Témoins était en faveur d'une réponse inflammatoire intense mais relativement brève et spécifique. Les concentrations maximales en IL-6 étaient atteintes entre 3 et 6 h après la réanimation, et étaient alors similaires à celles mesurées lors de sepsis [302]. Elles n'étaient en revanche plus significativement différentes de celle des animaux Sham au lendemain de l'arrêt cardiaque. Cette cinétique permettrait d'expliquer les résultats controversés concernant l'effet anti-inflammatoire de l'hypothermie au décours de l'arrêt cardiaque. La plupart des études cliniques ont en effet évalué les concentrations en cytokines à des temps plus tardifs que ceux investigués dans notre étude [12]. Par ailleurs, toutes les voies inflammatoires ne semblent pas activées uniformément au décours d'un arrêt cardiaque. Dans notre étude, seule une élévation des niveaux d'IL-6 a pu être mise en évidence, les niveaux de TNF- α ou d'IL-1 β étant restés inchangés. Cependant, dans la littérature clinique, certains travaux décrivent une augmentation rapide des concentrations de ces cytokines, qui persiste ensuite durant plusieurs jours [301, 303]. Ces divergences entre les données disponibles chez les patients et nos résultats expérimentaux pourraient s'expliquer par des phénomènes de translocations bactériennes et le développement secondaire d'une réaction immunitaire septique chez l'homme, qui n'ont pas été observés dans notre modèle. D'après Adrie *et al.*, la survenue d'une endotoxémie est en effet relativement fréquente chez les patients victimes d'un arrêt cardiaque. Dans leur étude, l'endotoxine bactérienne était détectée dans le plasma de 46% des patients analysés dans les 2 jours suivant l'arrêt cardiaque [71].

Cette étude nous a permis de démontrer que l'hypothermie, lorsqu'elle était induite quasi-immédiatement après la réanimation grâce à un court épisode de VLT, module de façon transitoire la réponse inflammatoire systémique induite par l'arrêt cardiaque. Cet effet pourrait constituer un des mécanismes par lesquels l'hypothermie améliore la survie et la fonction neurologique, ce qui impliquerait un rôle prédominant des événements inflammatoires précoces dans la physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque.

Étude n°2

**ULTRA-FAST HYPOTHERMIA SELECTIVELY
MITIGATES THE EARLY HUMORAL
RESPONSE AFTER CARDIAC ARREST**

Émilie Boissady, Matthias Kohlhauer, Fanny Lidouren,
Hakim Hocini, Nicolas Tchitchek, Nicolas Deye, Alain
Cariou, Philippe Micheau, Bijan Ghaleh, Renaud Tissier

Sous presse, *Journal of the American Heart
Association*

1 **Ultra-fast hypothermia selectively mitigates the early humoral response after cardiac**
2 **arrest**

3 Emilie BOISSADY, DVM, MSc ¹; Matthias KOHLHAUER, DVM, PhD ¹; Fanny LIDOUREN,
4 BSc ¹; Hakim HOCINI, PhD ^{1,2}; Cécile LEFEBVRE, PhD ^{1,2}; Sophie CHATEAU-JOUBERT,
5 PhD ¹; Nicolas MONGARDON, MD, PhD ^{1,3}; Nicolas DEYE, MD, PhD ⁴; Alain CARIOU, MD,
6 PhD ⁵; Philippe MICHEAU, Ing., PhD ⁶; Bijan GHALEH, PharmD, PhD, ¹; Renaud TISSIER*,
7 DVM, PhD ¹

8 ¹ Univ Paris Est Creteil, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INSERM, IMRB, F-94010 Creteil,
9 France

10 ² Vaccine Research Institute, Univ Paris Est-Creteil, F-94000, Creteil, France

11 ³ Service d'anesthésie-réanimation chirurgicale, DMU CARE, APHP, Hôpitaux Universitaires
12 Henri Mondor, Créteil, France

13 ⁴ Medical ICU, Inserm U942, Lariboisiere Hospital, APHP, F-75018, Paris, France

14 ⁵ Service de Réanimation Médicale, Hôpitaux Universitaires Paris Centre, Hopital Cochin,
15 Paris, France

16 ⁶ Université de Sherbrooke, Groupe Inolivent, Sherbrooke, Quebec, Canada

17

18 * Corresponding author: Renaud Tissier

19 Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort

20 7 avenue du Général de Gaulle

21 94700 Maisons-Alfort, France

22 Tel : +33143967302

23 Email: renaud.tissier@vet-alfort.fr

24 ORCID: 0000-0001-6602-939X

25 **Short Title:** Hypothermia and humoral immune response

26 **Journal subject terms:** Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiac Care;

27 **Cardiopulmonary Arrest**

28

29 **Abstract**

30 **Background:** Total liquid ventilation (TLV) has been shown to prevent neurological damage
31 though ultra-fast cooling in animal models of cardiac arrest (CA). We investigated whether its
32 neuroprotective effect could be explained by mitigation of early inflammatory events.

33 **Methods and results:** Rabbits were submitted to 10-min of ventricular fibrillation. After
34 resuscitation, they underwent normothermic follow-up (Control) or ultra-fast cooling by TLV
35 and hypothermia maintenance during 3h (TLV). Immune response, survival and neurological
36 dysfunction were assessed during 3 days. TLV improved neurological recovery and reduced
37 cerebral lesions and leukocytes infiltration as compared to Control (e.g., neurological
38 dysfunction score = 34 ± 6 vs $66\pm6\%$ at day 1, respectively). TLV also significantly reduced
39 interleukin (IL)-6 blood levels during the hypothermic episode (298 ± 303 vs 991 ± 471 pg/ml in
40 TLV vs Control at 3h post-resuscitation, respectively), but not after rewarming (752 ± 563 vs
41 741 ± 219 pg/ml in TLV vs Control at 6h post-resuscitation, respectively). *In vitro* assays
42 confirmed the high temperature-sensitivity of IL-6 secretion. Conversely, TLV did neither
43 modify circulating High-mobility group box-1 levels, nor immune cells recruitment into the
44 peripheral circulation. The link between IL-6 early transcripts (<8h) and neurological outcome
45 in a sub-population of the previously described EPO-ACR02 trial confirmed the importance of
46 this cytokine at the early stages, as compared to delayed stages (>8h).

47 **Conclusion:** The neuroprotective effect of hypothermic TLV was associated with a mitigation
48 of humoral IL-6 response. A temperature-dependent attenuation of immune cells reactivity
49 during the early phase of the post-cardiac syndrome could explain the potent effect of rapid
50 hypothermia.

51 **Clinical trial registration:** NCT00999583

52

53 **Key words:** Liquid ventilation; Critical care; Therapeutic hypothermia

54

55

56 **Non-standard abbreviations and Acronyms**

57 CA, cardiac arrest

58 DAMP, Damage Associated Molecular Pattern

59 ELISA, enzyme linked immunosorbent assays

60 HMGB1, High Mobility Group Box 1

61 IL, interleukin

62 LPS, lipopolysaccharide

63 PS100B, Protein S100B

64 TLV, total liquid ventilation

65

66

67

68 **Clinical perspective**

69 **What is new?** We already demonstrated that total liquid ventilation (TLV) could be very
70 efficient to prevent neurological damages through ultra-fast cooling properties in animal models
71 of cardiac arrest. In this study, we demonstrated that TLV-induced hypothermia also transiently
72 modulates the acute inflammatory response, which likely contributes to its neuroprotective
73 effect. Surprisingly, this anti-inflammatory effect was not due to a limitation of immediate cell
74 death after resuscitation, but to a direct downregulation of the subsequent innate immune
75 response and interleukin-6 early release. This further supports the importance of early
76 interventions for cooling and/or inflammation mitigation in clinical practice after cardiac arrest.

77 **What are the clinical implications?**

78 Our results show that the inflammatory events occurring during the first 3 h after resuscitation
79 play a major role in the pathophysiology of the post-cardiac arrest syndrome. From a
80 mechanistic point of view, it further emphasizes the role played by the early critical period of
81 immune overstimulation after cardiac arrest. Hypothermia might provide a transient tolerance
82 to these pro-inflammatory stimuli and prevent latter dysregulation of the immune response.
83 This is consistent with several experimental and clinical reports demonstrating an optimal
84 window of efficiency of rapid systemic hypothermia during the first 2-4 hours after resuscitation.

85

86

87 **Introduction**

88 Ischemia-reperfusion is responsible for neurological disabilities after cardiac arrest
89 (CA) and resuscitation ¹. In order to improve the patients outcome, targeted temperature
90 management is recommended, even if the ideal target temperature is still debated ². In
91 laboratory studies, strategies aiming at fastening cooling induction provide promising results
92 to further improve the ultimate neurological outcome ^{3,4}. Some clinical data are also supporting
93 the importance of early achievement of target temperature in humans after resuscitation ⁵.
94 Accordingly, our team developed an original technique to reduce the time-to-target
95 temperature through the total liquid ventilation (TLV) of the lungs with temperature-controlled
96 perfluorocarbons. We previously demonstrated its safety and efficiency for whole body-cooling
97 and prevention of the post-cardiac arrest syndrome in animal models ^{6,7}.

98 In experimental studies, hypothermia was shown to mitigate the inflammatory response
99 induced by ischemia-reperfusion through inhibition of pro-inflammatory cytokines generation
100 and attenuation of neuro-inflammation ^{8,9}. However, the anti-inflammatory benefit of
101 hypothermia is still controversial in clinical settings ¹⁰. This discrepancy might be explained by
102 the delayed institution of hypothermia in clinical conditions, with target temperature often
103 achieved several hours after resuscitation. Thus, patients might not benefit from the effect of
104 rapid hypothermia on the triggering phase of inflammation, which remains poorly explored. Our
105 hypothesis is that hypothermia mitigates the early inflammatory response when achieved
106 rapidly, which could contribute to the greater effect of rapid cooling after CA ^{6,7}. In addition,
107 several studies support the fact that inflammation is a major contributor of the propagation of
108 neuronal death after ischemia-reperfusion ^{11,12}. For instance, recent clinical studies
109 demonstrated the importance of the systemic inflammatory response on the patient's outcome,
110 with a close correlation between IL-6 circulating levels and mortality ^{11,12}. On the bench side,
111 IL-6 signaling was further shown to contribute to no-reflow ¹³, blood-brain barrier (BBB)
112 dysfunction after brain ischemia ¹⁴, ultimately exacerbating neuroinflammation. Besides,
113 previous reports from our group showed that the neuroprotective effects of TLV are associated

114 with a preservation of the BBB integrity and normalization of the cerebral blood flow in the acute
115 phase following resuscitation ^{8,15}. Those effects might represent direct consequences of the
116 anti-inflammatory potential of the procedure.

117 Accordingly, we sought to evaluate the effect of ultra-fast hypothermia with TLV on the
118 inflammatory process of the post-cardiac arrest syndrome, in line with the ultimate
119 neuroprotective properties. We also investigated a putative link with early cell death reduction
120 through the assessment of the pro-inflammatory mediator High Mobility Group Box 1
121 (HMGB1), as a key “Damage Associated Molecular Patterns” (DAMP) after cardiac arrest. ^{16,17}.
122 Finally, in order to support our experimental findings, we further evaluated the link between
123 humoral response and neurological outcome in clinical conditions in patients included in the
124 previously described EPO-ACR02 trial population.

125

126 **Material and methods**

127 The data that support the findings of this study are available from the corresponding
128 author upon reasonable request. The animal instrumentation and ensuing experiments were
129 conducted in accordance with official French regulations after approval by the local ethics
130 committee (ComEth AnSES/ ENVA/UPEC no. 16; project 2017111414547261).

131

132 *Animal preparation and clinical follow-up*

133 Male New Zealand rabbits (2.5 to 3.0 kg) were anesthetized using zolazepam,
134 tiletamine and pentobarbital (all 20-30 mg/kg, IV), as well as buprenorphine (30 µg/kg, IV). We
135 did not include female since they could present different hormonal status. They were intubated
136 and mechanically ventilated using a volume-controlled ventilator (Alpha Lab-Minerve,
137 Esternay, France), with a tidal volume set at 12 mL/kg and FiO₂ at 0.21, respectively.
138 Respiratory rate was initially set at 28 cycles/min and then adjusted to maintain end-tidal CO₂
139 around 35 to 40 mmHg. After administration of rocuronium bromide (1 mg/kg IV), two
140 electrodes were implanted on the inner muscular wall and inserted into the oesophagus for
141 subsequent induction of ventricular fibrillation. Body temperatures and ECG were followed
142 throughout the experiments, as well as systemic blood pressure through a catheter inserted
143 into the ear artery. After a period of stabilization, an alternative current (12 V, 4 mA; 2.5
144 minutes) was delivered between the electrodes to induce ventricular fibrillation. Concomitantly,
145 mechanical ventilation was stopped. After 10 min of untreated fibrillation, cardiopulmonary
146 resuscitation was performed using external manual cardiac massage (200 external chest
147 compressions/min), electric defibrillation (10 J/kg), and intravenous administration of
148 epinephrine (15 µg/kg IV). During CPR, animals were reconnected to the ventilator that was
149 switched to a respiratory mode allowing to deliver a continuous flow of oxygen (FiO₂ = 100%).
150 Animals were excluded if resumption of spontaneous circulation (ROSC) was not achieved in
151 less than 10 min after the beginning of cardiopulmonary resuscitation. After resumption of
152 spontaneous circulation (ROSC), epinephrine administration was allowed to reach a target

153 mean blood pressure of 70 mm Hg. After 6 h of follow-up, animals were awoken for subsequent
154 neurological and survival follow-up during 3 days. Neurological dysfunction was evaluated
155 blindly and daily using a clinical score previously validated in rabbits (0% = normal, 100% =
156 death)^{6,8}. For ethical considerations, animals eliciting a neurologic dysfunction score above
157 80% at 24 hours or 60% at 48 hours were prematurely euthanized. All surviving animals were
158 euthanized at the end of the 3 days follow-up for histological analysis.

159

160 *Experimental protocol*

161 As illustrated in Figure 1, animals were divided into three experimental groups. The first
162 group was submitted to animal preparation and subsequent follow-up with no CA (Sham group,
163 n=5). The two other groups underwent electrical induction of CA and then were randomly
164 allocated to Control (n=6) or TLV (n=6) procedure after ROSC. The control group did not
165 receive any additional procedure and was maintained under normothermic condition with
166 thermal pads until awakening. In the TLV group, ultrafast cooling was induced by TLV started
167 15 min after ROSC. The lungs were filled by 10 mL/kg of perflubron (Exflur, Round Rock, TX,
168 USA), with an initial temperature of 20°C and a progressive increase to 33°C. The liquid
169 ventilator was set to a tidal volume of 10 mL/kg, a respiratory frequency of 8 cycles/min, and a
170 positive end-expiratory pressure of 2 cm H₂O. We used a previously described algorithm with
171 a volume- and pressure-controlled liquid ventilation mode. After 20 minutes of TLV and
172 achievement of the hypothermic target temperature of 33°C, animals were weaned by
173 prolonged exhalation at -15 cm H₂O. The liquid ventilator was then disconnected and animals
174 were shifted to conventional mechanical ventilation. Hypothermia was further maintained by
175 cold blankets during 3 h. Animals were then slowly rewarmed with infrared lights and thermal
176 pads during 4 h before weaning from conventional ventilation and awakening. At the end of
177 procedure, animals were awakened for survival follow-up. In both groups, they were housed
178 in a closed cage enriched in oxygen for 24 h and received analgesics (buprenorphine, 30
179 µg/kg, IM) every day for 3 days.

180 *Evaluation of blood inflammatory markers and leukocytes*

181 Using enzyme linked immunosorbent assays (ELISA), blood levels of HMGB1 (Abxexa,
182 Milton, United-Kingdom) and protein S100B (PS100B; FineTest, Wuhan, China) were
183 evaluated as markers of general and cerebral cell death. Interleukin-6 (IL-6; R&D Systems,
184 Minneapolis, USA), interleukin-1 β (IL1 β ; R&D Systems, Minneapolis, USA), tumor necrosis
185 factor- α (TNF- α , R&D Systems, Minneapolis, USA) and interleukin-10 (IL-10; Elabscience,
186 Houston, USA) were also measured using the same method. In the Control and TLV groups,
187 blood samples were also prepared for flow cytometry and leukocytes counts, as described in
188 additional material (Data S1).

189

190 *Histological analyses*

191 At the end of the 3 days follow-up, rabbits were euthanized and perfused with 5%
192 paraformaldehyde through both carotids. Brains were then removed, post-fixed with
193 paraformaldehyde and embedded in paraffin. Brain coronal sections were stained with
194 hematoxylin and eosin. Neurons were labelled by Fluorojade C staining (Merck Millipore,
195 Burlington, USA). For each animal and each analyzed region, positive neurons were blindly
196 counted in five non-overlapping fields of the same section at 200x magnification. Data were
197 expressed as the average value of the five counts.

198 Immunohistochemical analyses were also performed to quantify the invasion of the
199 brain by peripheral immune cells. Neutrophils and T-cells were detected with a monoclonal
200 antibody against a cell surface antigen that is expressed by a subset of T-cells, thymocytes,
201 and neutrophils (RPN3/57, BioRad, Hercules, CA, USA, diluted 1:100).

202

203 *Whole blood stimulation experiment*

204 To evaluate the proper effect of hypothermia on immune cells reactivity, blood
205 leukocytes were stimulated *in vitro* with toll-like receptor ligands and incubated at different
206 temperatures. Accordingly, arterial blood was withdrawn from healthy rabbits using

207 heparinized syringes and diluted 1:1 with Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI).
208 Then samples were immediately stimulated with lipopolysaccharide (LPS; 100 ng/ml; Sigma-
209 Aldrich, Saint-Louis, USA) and incubated either at 33°C or at 38°C during 2 or 6 hours. At the
210 end of the incubation period, samples were centrifuged at 600 g for 10 minutes at 4°C.
211 Supernatant was stored at -80°C and levels of IL-6, IL-1 β , and TNF- α were determined by
212 ELISA method, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis,
213 USA).

214

215 *Evaluation of cytokine expression in human samples after CA*

216 In order to further evaluate clinical relevance of our results, we leveraged available data
217 from a published clinical trial initially designed to evaluate the effect of erythropoietin after out
218 of hospital cardiac arrest (ancillary study of NCT00999583). In the corresponding study, blood
219 samples were collected in 69 comatose survivors of cardiac arrest at hospital admission, and
220 1 and 3 days after resuscitation (the exact time of sampling was registered) and exhaustive
221 analysis of blood gene expression (Illumina HumanHT-12 V4 BeadChip; >34,000 genes) was
222 performed ¹⁸. Patients were classified into two categories representing neurological favorable
223 outcome (Cerebral Performance Category [CPC] = 1-2) vs unfavorable outcome (CPC>2) at
224 Day 60 after cardiac arrest. We extracted data corresponding to the cytokines transcription
225 levels, time of sampling after CA and neurological outcome, in order to compare IL-6, TNF- α
226 and IL-1 β expression between patients with good vs bad neurological outcome. The samples
227 were grouped for comparison based on the time they were collected after cardiac arrest (i.e.,
228 within 0 to 8 h after CA, n= 25 vs 33 in the group with good vs bad outcome, respectively and
229 within 8 to 36 h after CA, n= 28 vs 35 in the group with good vs bad outcome, respectively).

230

231

232 *Statistical Analysis*

233 Data were expressed as mean±SE, except if mentioned. Continuous variables were
234 compared between groups using a two-way analysis of variance for repeated measures,
235 considering group, time and interaction terms. If necessary, post-hoc analyses were performed
236 at each time point using a Student t-test with Bonferroni correction. Neurological dysfunction,
237 histological scores and cytokines transcription level in patients were compared between
238 groups using a nonparametric Mann-Whitney test. For the cytokines transcription level in
239 patients, two different comparisons were made, *i.e.*, for samples withdrawn < 8 h or 8-36 h
240 after resuscitation. Correlation studies among clinical score and cytokine blood levels were
241 performed using the non-parametric Spearman analysis. The primary outcome was the
242 neurological dysfunction score, as a marker of TLV-induced neuroprotection. We had to
243 include 5 animals in each group in order to evidence a 40% reduction in neurological
244 dysfunction at Day 1 ($\beta=0.1$). In the Control and TLV groups, 6 animals were included to
245 account for possible false positive results when testing numerous secondary outcomes.
246 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 ®. Significant differences were
247 determined at p value less than or equal to 0.05.

248

249

250 **Results**

251 *TLV provided rapid mild hypothermia without hemodynamic adverse effect*

252 Seventeen rabbits successfully underwent the whole protocol of the main study (n=6,
253 6 and 5 in Control TLV and Sham groups). Five animals were excluded immediately after
254 cardiac arrest, due to the lack of successful resuscitation before group allocation. In Control
255 and TLV groups, other animals were successfully resuscitated with similar times to ROSC after
256 cardiac arrest (3.9 ± 1.2 and 2.9 ± 0.7 min in Control and TLV group, respectively). In the TLV
257 group, the body target temperature of 33°C was achieved within 30 min after resuscitation (i.e.,
258 15 min after the institution of TLV), whereas it was maintained at 38°C during the whole
259 procedure in the Control group (Figure 1B). During the hypothermic period, mean arterial
260 pressure did not differ but heart rate was decreased in the TLV group vs Control. The amount
261 of epinephrine required to prevent hypotension was significantly lower in the TLV group as
262 compared to Control. No significant difference in conventional biochemical parameters
263 between the two groups was evidenced before and after cardiac arrest (Supplemental Table
264 1).

265

266 *TLV mitigates the immune response after CA through a specific reduction in IL-6 blood levels*
267 *during the hypothermic episode itself*

268 As illustrated in Figure 2A, blood levels of HMGB1 increased rapidly after resuscitation
269 in both Control and TLV groups but there was no difference between the two groups at 30 min
270 post-ROSC (30 ± 7 , 35 ± 13 and 10 ± 0.1 ng/ml in Control, TLV and Sham group, respectively),
271 suggesting a similar magnitude for immediate cell death after resuscitation. Likewise, TLV did
272 not modify the rise in PS100B plasma levels as compared to Control group during the first 3
273 hours after ROSC. Indeed, baseline concentrations of PS100B increased from $124\pm 62\%$ and
274 $92\pm 37\%$ at 180 min post-ROSC in TLV and Control groups, as compared to baseline values
275 (1165 ± 310 and 1080 ± 181 pg/ml, respectively).

276 As illustrated in Figure 2B, a striking increase in plasma IL-6 level was observed after
277 CA in Control vs Sham groups. Conversely, no difference was observed regarding TNF- α
278 release (concentrations below the limit of quantification throughout the follow-up) nor IL-1 β
279 blood levels. In the TLV group, IL-6 blood levels were significantly decreased during the
280 hypothermic episode as compared to Control conditions (180 min after CA). Conversely, IL-6
281 levels were no more reduced as compared to Control after rewarming (Figure 2B).

282 In line with this modification of the early pro-inflammatory response, TLV reduced the
283 blood levels of IL-10 anti-inflammatory cytokine at 24 h after CA as compared to Control. This
284 suggests that TLV does not only delay the onset of IL-6 signaling until rewarming but also
285 mitigates the compensatory anti-inflammatory response after CA.

286 Despite the above mentioned effects, blood leukocytes similarly increased in TLV vs
287 Control groups after cardiac arrest (Supplemental 1). The leukocytosis was mainly caused by
288 a mobilization of granulocytes, whereas all lymphocytes population subsets (including Th cells,
289 cytotoxic cells and B lymphocytes) showed slight decrease over time. Hypothermia modified
290 neither the influx of granulocytes to the peripheral circulation, nor the
291 granulocytes/lymphocytes proportions after CA.

292

293 *Ultra-fast hypothermia improved the ultimate neurological outcome*

294 Ultrafast cooling by TLV was associated with a dramatic improvement of the
295 neurological recovery as compared to Control conditions. As shown in Figure 3A, the
296 neurological dysfunction score achieved 34 \pm 6% at day 1 in the TLV group as compared to
297 66 \pm 6% in the Control group. In the latter group, all animals still elicited severe neurological
298 dysfunction at Day 2, leading to premature euthanasia as prospectively decided with the ethical
299 committee (neurological dysfunction score above 60%). In the TLV group, all animals had
300 lower neurological dysfunction score at Day 2 (21 \pm 5%) vs Day 1, allowing the further follow-
301 up until Day 3. The resulting impact on survival outcome is illustrated by Figure 3B. In order
302 to confirm the neuroprotective effect of TLV, histopathological evaluations were performed

303 using Fluorojade C staining for the identification of degenerating neurons. A significant
304 reduction of neuronal injuries was confirmed in parasagittal cortex and hippocampus in the
305 TLV group as compared to Control (e.g., 4.5 ± 4.8 vs 21.3 ± 15.4 degenerating cells/ field in the
306 hippocampus, respectively) (Fig 3C and 3D).

307 As shown in Figure 4, immunohistochemical analyses revealed an increase in the
308 amount of leukocytes into the brain parenchyma of Control animals as compared to Sham.
309 This infiltration was significantly reduced in the TLV group.

310

311 *Hypothermia inhibit the immune cells reactivity in vitro*

312 To assess the proper effect of mild hypothermia on peripheral blood cells secretory
313 activity, additional *in vitro* experiments were completed for the evaluation of immune cells
314 reactivity. For this purpose, proinflammatory cytokines production was determined at either
315 33°C or 38°C after stimulation with LPS (Figure 5). IL-6, IL- 1β and TNF- α concentrations
316 increased as early as 2 h after stimulation in comparison to baseline, but the increase was
317 reduced at 33°C vs 38°C . IL-6 production was divided by 3 compared to that at 38°C ,
318 independently from the duration of incubation.

319

320 *Early immune response and IL-6 transcripts are also associated with ultimate outcome in* 321 *humans*

322 In order to confirm the importance of early vs late IL-6 levels after CA, we analyzed
323 mRNA blood levels of IL-6, IL- 1β and TNF α in patients¹⁸. We compared the values of these
324 cytokines when evaluated from samples withdrawn very early (< 8 h) as compared to later
325 ones (8-30 hours) after CA in patients with poor vs favorable outcome (CPC1-2 vs CPC>2).
326 As shown by Supplemental Figure 2, IL-6 levels were significantly different in patients with
327 good vs bad ultimate outcome at early time points (*i.e.*, < 8 h after CA) but not later after ROSC
328 (*i.e.*, 8-36 h after CA). IL- 1β and TNF- α were similar among patients with poor vs bad outcome,

329 regardless the timing of investigation. This again highlights the functional importance of IL-6
330 during the early phase after CA.
331

332 **Discussion**

333 In this study, we investigated the effect of early hypothermia induced by TLV on the
334 initiation of the inflammatory response following CA. Surprisingly, the anti-inflammatory
335 properties of TLV were not mediated by reduction of early cell death and subsequent release
336 of danger signals. Early hypothermia rather uncoupled the acute immune signalization and the
337 ultimate deleterious effects after CA. As there was no difference regarding mobilization of
338 immune cells towards peripheral circulation among groups, we assumed that hypothermia
339 simply acted through direct downregulation of the immune cells reactivity, which was further
340 corroborated by *in vitro* results of whole blood stimulation assays.

341 As stated above, hypothermia instituted rapidly after ROSC did not reduce early cell
342 death after CA as compared to normothermic animals, as evidenced by similar blood levels of
343 HMGB1 and PS100B. Indeed HMGB1 is known to be a prototypical DAMP released by a great
344 variety of cells, whereas PS100B mainly reflects cerebral cell death. Since hypothermia was
345 well shown to prevent excitotoxicity¹⁹ or to dampen ROS generation^{20,21}, this suggests that
346 cells already endured irreversible lesions during the no-flow period, and early cell death after
347 CA might not be prevented by post-reperfusion interventions. Conversely, hypothermia
348 seemed to partially block the inflammatory consequences of cell necrosis. A lower systemic
349 humoral immune response was indeed evidenced regarding IL-6 blood levels, in line with
350 improved neurological outcome at the end of the follow-up. It was associated with a reduction
351 of delayed neuronal lesions as shown by Fluorojade C analyses. Thus, in our experimental
352 setting, hypothermia appeared to uncouple the early processes triggered by ischemia-
353 reperfusion from their delayed consequences, *i.e.*, secondary cerebral lesions.

354 Unexpectedly, this uncoupling did not require a total blunt of inflammatory events as IL-
355 6 blood levels returned to Control value in the TLV group during the rewarming period.
356 Hypothermia rather delayed the secretion of pro-inflammatory mediators rather than
357 completely suppressing it. This is fully in line with the results of the *in vitro* experiments,
358 showing a direct relation hip between temperature and IL-6 secretion by blood immune cells.

359 Indeed, a major reduction in cytokine concentration was observed in blood samples incubated
360 at 33°C vs 38°C. The transient repression exerted by hypothermia on the systemic
361 inflammation in the present rabbit study then suggest that inflammatory events occurring
362 during the first 3 h after ROSC play a major role in the pathophysiology of the post-cardiac
363 arrest syndrome. That is the reason why we attempted to determine whether cytokine blood
364 levels are also linked with the ultimate patient outcome at rather early vs delayed time points
365 in clinical conditions. We had the opportunity to evaluate this hypothesis in the previously
366 reported EPO ACR-02 population, in which we tested the transcriptomic signature after cardiac
367 arrest ¹⁸. The results further corroborated our hypothesis, showing a correlation between IL-6
368 transcripts levels and neurological recovery only at very early but no later time points after
369 ROSC in patients (*i.e.*, 0-8 vs 8-36 h). From a mechanistic point of view, it further emphasizes
370 the importance of an early critical period of immune overstimulation after cardiac arrest.
371 Hypothermia might provide a transient tolerance to these pro-inflammatory stimuli and prevent
372 latter dysregulation of the immune response. This is also consistent with several experimental
373 and clinical reports demonstrating an optimal window of efficiency of rapid hypothermia during
374 the first 2-4 hours after ROSC ^{3,4,22,23}. For instance, a recent sub-study of the ROC Continuous
375 Chest Compressions Trial showed higher benefits of hypothermia after CA when initiated
376 during the first 122 min after ROSC ²³.

377 Importantly, early hypothermia also attenuated the delayed compensatory anti-
378 inflammatory response occurring after rewarming in our experimental conditions, as suggested
379 by the decrease in IL-10 concentrations 24 h after resuscitation in the TLV group. This
380 secondary anti-inflammatory reaction is well-described in patients, who tend to spontaneously
381 develop an immunodeficiency state called endotoxin tolerance, characterized by impaired
382 leukocytes reactivity to infectious agents and thus enhanced sensitivity to nosocomial
383 infections ^{24,25}. By diminishing the vigor of the initial pro-inflammatory reaction, early
384 hypothermia might help maintaining the immunological balance after rewarming.

385 As stated above, another important finding is the predominant IL-6 response after
386 cardiac arrest in the present study, while we did not observe a significant increase in IL-1 β not
387 TNF- α blood levels or transcripts. Though we do not have the direct demonstration of the
388 causal role in the protective effect of TLV, several hypothesis can be raised regarding previous
389 findings from our groups and others^{10,21-23}. For instance, IL-6 has been shown to increase
390 blood brain barrier permeability by modulating the tight junction proteins¹⁴ and to promote
391 peripheral cell infiltration into tissues during acute inflammation²⁶. Thus, downregulation of IL-
392 6 secretion could contribute to blood brain barrier preservation, a known-benefit of TLV,
393 previously highlighted by our team⁸, during a period of exacerbated susceptibility. IL-6 has also
394 been shown to stimulate coagulation and microvascular thrombosis, and thus could be
395 responsible for no-reflow phenomenon. Figure 6 illustrates a schematic representation of this
396 putative action mechanism of TLV on acute inflammation, summarizing the putative link
397 between cerebral microvascular disorders and IL-6 signaling^{8,13-15,27-29}.

398 Finally, this study also provides detailed information regarding the time course of the
399 acute inflammatory events contributing to post-cardiac arrest syndrome. In our experimental
400 setting, temporal pattern of plasma IL-6 increase was in favor of a strong but relatively short
401 pro-inflammatory humoral response. Maximal IL-6 concentrations were reached 3 h after
402 ROSC, with levels similar to those reported in sepsis³⁰, but there was no longer significant
403 difference between Control and TLV groups at day one of follow up. This kinetic might explain
404 the failure of clinical studies to demonstrate the anti-inflammatory properties of mild
405 hypothermia as they generally focused on latter time points after resuscitation. Furthermore,
406 during the first 24 h after resuscitation, the proinflammatory signalization seemed specifically
407 mediated by elevation of IL-6 levels, with very little contribution of other pro-inflammatory
408 cytokines such as TNF- α and IL-1 β . Although our observations were conducted at a systemic
409 level and deserves additional evaluation in brain tissue, it strongly suggests independent
410 regulation of these pro-inflammatory cytokines in this context. It was unexpected as both TNF-
411 α and IL-1 β were reported to be involved early in the post-cardiac arrest inflammatory cascade,

412 primarily released by leukocytes and endothelial cells^{24,25,31}. This discrepancy, as well as late
413 elevation in IL-6 plasma concentration after CA in patients, may reflect bacterial translocation
414 and secondary development of a sepsis rather than direct inflammatory consequences of CA
415 and should be addressed differently than by anti-inflammatory interventions. In that regard,
416 Adrie *et al.* reported frequent endotoxemia in post-cardiac arrest patients (endotoxin was
417 detected in the plasma of 46% patients on the first 2 days after CA)²⁴.

418 Importantly, our study presents some limitations. First, hypothermia was only
419 maintained during a 3-hours period after cardiac arrest, as compared to 24-36 h which are
420 usually applied in the clinical arena. Our rationale was that early achievement of whole-body
421 hypothermia, only for a short period, is sufficient to provide potent neuroprotection, as well
422 demonstrated in previous animal studies with TLV^{6-8,32}. We chose to evaluate the mechanism
423 underlying this particular modality of protection offered by hypothermia, which seems more
424 “specific” of the action of very early cooling. Longer durations of hypothermia may be
425 associated with more profound alteration of the immune response, such as immunoparalysis.
426 Second, the rabbit immune response following acute ischemic insult may not exactly reflect
427 the one that take place in human, such as already suspected in rodents models of inflammatory
428 diseases³⁰. Finally, the small sample sizes, may lead to an insufficient statistical power to
429 evidence small differences in some of the studied markers, such as HMGB1, PS100B or IL-
430 1 β .

431
432 In conclusion, we demonstrated that hypothermia, when achieved with TLV early after
433 ROSC, transiently modulates the acute inflammatory response, which likely contributes to its
434 neuroprotective effect. Surprisingly, this anti-inflammatory effect did not rely on limitation of
435 immediate ischemia-reperfusion mediated cell death, but on direct downregulation of the
436 subsequent innate immune response and IL-6 very early release. These findings support the
437 importance of early interventions in clinical practice and rapid institution of hypothermia after
438 cardiac arrest.

439

440 **References**

- 441 1. Neumar RW, Nolan JE, Adrie C, Aibiki M, Berg RA, Böttiger BW, Callaway C, Clark RSB,
442 Geocadin RG, Jauch EC, et al. Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology,
443 pathophysiology, treatment, and prognostication: A Scientific Statement from the
444 International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association
445 Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and
446 Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council
447 on Clinical Cardiology; the Council on Stroke. *Circulation* 2008;118:2452-2483.
- 448 2. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes
449 J, Kjaergaard J, Kuiper M, et al. Targeted temperature management at 33°C versus 36°C
450 after cardiac arrest. *N Engl J Med*. 2013;369:2197–2206.
- 451 3. Che D, Li L, Kopil CM, Liu Z, Guo W, Neumar RW. Impact of therapeutic hypothermia
452 onset and duration on survival, neurologic function, and neurodegeneration after cardiac
453 arrest. *Crit Care Med*. 2011;39:1423–1430.
- 454 4. Kuboyama K, Safar P, Radovsky A, Tisherman SA, Stezoski SW, Alexander H. Delay in
455 cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after
456 cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study. *Crit Care Med*. 1993;21:1348–
457 1358.
- 458 5. Uribarri A, Bueno H, Pérez-Castellanos A, Loughlin G, Sousa I, Viana-Tejedor A,
459 Fernández-Avilés F. Impact of time to cooling initiation and time to target temperature in
460 patients treated with hypothermia after cardiac arrest. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*.
461 2015;4:365–372.
- 462 6. Chenoune M, Lidouren F, Adam C, Pons S, Darbera L, Bruneval P, Ghaleh B, Zini R,
463 Dubois-Randé J-L, Carli P, et al. Ultrafast and whole-body cooling with total liquid
464 ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in
465 rabbits. *Circulation*. 2011;124:901–911, 1–7.
- 466 7. Kohlhauer M, Boissady E, Lidouren F, de Rochefort L, Nadeau M, Rambaud J, Hutin A,
467 Dubuisson R-M, Guillot G, Pey P, et al. A new paradigm for lung-conservative total liquid
468 ventilation. *EBioMedicine*. 2019;52:102365.
- 469 8. Kohlhauer M, Lidouren F, Remy-Jouet I, Mongardon N, Adam C, Bruneval P, Hocini H,
470 Levy Y, Blengio F, Carli P, et al. Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective
471 Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial
472 Cardiac Arrest. *Crit Care Med*. 2015;43:e420.
- 473 9. Deng H, Han H S, Cheng D, Sun G H, Yenari MA. Mild Hypothermia Inhibits Inflammation
474 After Experimental Stroke and Brain Inflammation. *Stroke*. 2003;34:2495–2501.
- 475 10. Beurskens CJ, Horn J, de Boer AMT, Schultz MJ, van Leeuwen EM, Vroom MB,
476 Juffermans NP. Cardiac arrest patients have an impaired immune response, which is not
477 influenced by induced hypothermia. *Crit Care*. 2014;18:R162.
- 478 11. Bro-Jeppesen J, Kjaergaard J, Stammet P, Wise MP, Hovdenes J, Åneman A, Horn J,
479 Devaux Y, Erlinge D, Gasche Y, et al, TTM-Trial Investigators. Predictive value of
480 interleukin-6 in post-cardiac arrest patients treated with targeted temperature management
481 at 33 °C or 36 °C. *Resuscitation*. 2016;98:1–8.

- 482 12. Vaahersalo J, Skrifvars MB, Pulkki K, Stridsberg M, Røsjø H, Hovilehto S, Tiainen M,
483 Varpula T, Pettilä V, Ruokonen E, et al. Admission interleukin-6 is associated with post
484 resuscitation organ dysfunction and predicts long-term neurological outcome after out-of-
485 hospital ventricular fibrillation. *Resuscitation*. 2014;85:1573–1579.
- 486 13. Tang YH, Vital S, Russell J, Seifert H, Granger DN. Interleukin-6 mediates enhanced
487 thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia.
488 *Exp Neurol*. 2015;271:351–357.
- 489 14. Zhang J, Sadowska GB, Chen X, Park SY, Kim J-E, Bodge CA, Cummings E, Lim Y-P,
490 Makeyev O, Besio WG, et al. Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier
491 function in the ovine fetus. *FASEB J*. 2015;29:1739–1753.
- 492 15. Demené C, Maresca D, Kohlhauer M, Lidouren F, Micheau P, Ghaleh B, Pernot M, Tissier
493 R, Tanter M. Multi-parametric functional ultrasound imaging of cerebral hemodynamics in
494 a cardiopulmonary resuscitation model. *Sci Rep*. 2018;8:16436.
- 495 16. Sugita A, Kinoshita K, Sakurai A, Chiba N, Yamaguchi J, Kuwana T, Sawada N, Hori S.
496 Systemic impact on secondary brain aggravation due to ischemia/reperfusion injury in
497 post-cardiac arrest syndrome: a prospective observational study using high-mobility group
498 box 1 protein. *Crit Care*. 2017;21:247.
- 499 17. Omura T, Kushimoto S, Yamanouchi S, Kudo D, Miyagawa N. High-mobility group box 1
500 is associated with neurological outcome in patients with post-cardiac arrest syndrome after
501 out-of-hospital cardiac arrest. *J Intensive Care*. 2016;4:37.
- 502 18. Tissier R, Hocini H, Tchitchek N, Deye N, Legriel S, Pichon N, Daubin C, Hermine O, Carli
503 P, Vivien B, et al. Early blood transcriptomic signature predicts patients' outcome after out-
504 of-hospital cardiac arrest. *Resuscitation*. 2019;138:222–232.
- 505 19. Hachimi-Idrissi S, Van Hemelrijck A, Michotte A, Smolders I, Sarre S, Ebinger G,
506 Huyghens L, Michotte Y. Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release
507 and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats.
508 *Brain Res*. 2004;1019:217–225.
- 509 20. Horiguchi T, Shimizu K, Ogino M, Suga S, Inamasu J, Kawase T. Postischemic
510 hypothermia inhibits the generation of hydroxyl radical following transient forebrain
511 ischemia in rats. *J Neurotrauma*. 2003;20:511–520.
- 512 21. Maier CM, Sun GH, Cheng D, Yenari MA, Chan PH, Steinberg GK. Effects of Mild
513 Hypothermia on Superoxide Anion Production, Superoxide Dismutase Expression, and
514 Activity Following Transient Focal Cerebral Ischemia. *Neurobiol Dis*. 2002;11:28–42.
- 515 22. Schock RB, Janata A, Peacock WF, Deal NS, Kalra S, Sterz F. Time to Cooling Is
516 Associated with Resuscitation Outcomes. *Ther Hypothermia Temp Manag*. 2016;6:208–
517 217.
- 518 23. Stanger D, Kawano T, Malhi N, Grunau B, Tallon J, Wong GC, Christenson J, Fordyce CB.
519 Door-to-Targeted Temperature Management Initiation Time and Outcomes in Out-of-
520 Hospital Cardiac Arrest: Insights From the Continuous Chest Compressions Trial. *J Am
521 Heart Assoc*. 2019;8:e012001.
- 522 24. Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I, Monchi M, Vinsonneau C, Fitting C, Fraisse F, Dinh-
523 Xuan AT, Carli P, Spaulding C, et al. Successful cardiopulmonary resuscitation after
524 cardiac arrest as a “sepsis-like” syndrome. *Circulation*. 2002;106:562–568.

- 525 25. Adrie C, Laurent I, Monchi M, Cariou A, Dhainaou J-F, Spaulding C. Postresuscitation
526 disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome?: *Curr Opin Crit Care*. 2004;10:208–
527 212.
- 528 26. McLoughlin RM, Jenkins BJ, Grail D, Williams AS, Fielding CA, Parker CR, Ernst M, Topley
529 N, Jones SA. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation.
530 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9589–9594.
- 531 27. Park JS, Arcaroli J, Yum H-K, Yang H, Wang H, Yang K-Y, Choe K-H, Strassheim D, Pitts
532 TM, Tracey KJ, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility
533 group box 1 protein. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2003;284:C870-879.
- 534 28. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger A-C, Bloom O, Erlandsson-Harris H,
535 Janson A, Kokkola R, Zhang M, Yang H, Tracey KJ. High Mobility Group 1 Protein (Hmg-
536 1) Stimulates Proinflammatory Cytokine Synthesis in Human Monocytes. *J Exp Med*.
537 2000;192:565–570.
- 538 29. Asavarut P, Zhao H, Gu J, Ma D. The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ
539 injury. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2013;51:28–33.
- 540 30. Oda S, Hirasawa H, Shiga H, Nakanishi K, Matsuda K, Nakamura M. Sequential
541 measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response
542 syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*. 2005;29:169–175.
- 543 31. Niemann JT, Rosborough JP, Youngquist S, Shah AP, Lewis RJ, Phan QT, Filler SG.
544 Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac
545 arrest in swine. *J Interferon Cytokine Res*. 2009;29:749–758.
- 546 32. Darbera L, Chenoune M, Lidouren F, Kohlhauer M, Adam C, Bruneval P, Ghaleh B,
547 Dubois-Randé J-L, Carli P, Vivien B, et al. Hypothermic liquid ventilation prevents early
548 hemodynamic dysfunction and cardiovascular mortality after coronary artery occlusion
549 complicated by cardiac arrest in rabbits. *Crit Care Med*. 2013;41:e457–e465.
- 550 33. Seok J, Warren HS, Cuenca AG, Mindrinos MN, Baker HV, Xu W, Richards DR, McDonald-
551 Smith GP, Gao H, Hennessy L, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic
552 human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:3507–3512.
- 553
- 554

555 **Acknowledgments:** The authors are greatly indebted to Dr Delphine Le Roux, Jean-Luc
556 Servely and the BioPole Alfort for high level of expertise and facilities for biological analyses.

557

558 **Source of Funding:** This study was supported by the Agence Nationale pour la Recherche
559 (COOLIVENT Grant).

560

561 **Conflict of Interest Disclosures:** R Tissier is named as inventor on a patent on cooling with
562 liquid ventilation (US20120226337 A1). P Micheau declares owning patents on liquid
563 ventilation (US Patents # 7,726,311; Preliminary US patent 61/838,896). M Kohlhauer, P
564 Micheau and R Tissier are shareholders of a start-up company dedicated to the clinical
565 research on total liquid ventilation (Orixha).

566

567 **Supplemental material:** Supplemental Method, Supplemental Figure 1, Supplemental Figure
568 2, Supplemental Table 1.

569

570 **Figure 1: Experimental protocol, temperature and hemodynamic parameters.**

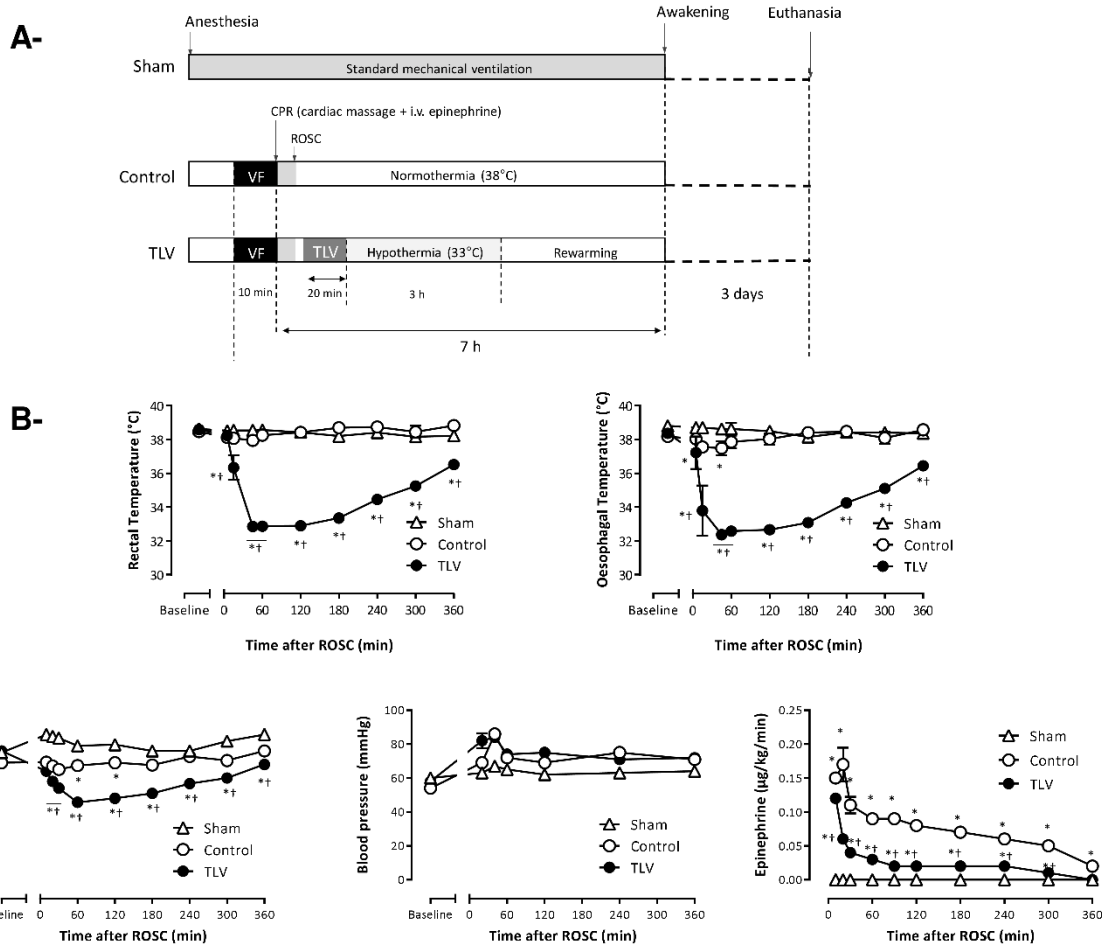
571 A- Experimental protocol illustrating the different procedures. After resuscitation, animals were
572 randomly assigned to a conventional follow-up under normothermic mechanical ventilation
573 (Control group, n=6) or to hypothermic total liquid ventilation (TLV, n=6). A third group was
574 submitted to a Sham procedure with no cardiac arrest (n=5). Animals were excluded if
575 resumption of spontaneous circulation (ROSC) was not achieved in less than 10 min after the
576 beginning of cardiopulmonary resuscitation.

577 B- Oesophageal and rectal temperatures, mean arterial pressure, heart rate, and epinephrine
578 infusion rate throughout the experimental protocol in the different groups.

579 *Data are expressed as mean±sem. Statistical comparisons were only made between groups*
580 *but not among different time points; *, p<0.05 vs corresponding Sham; †, p<0.05 vs*
581 *corresponding Control; VF, ventricular fibrillation.*

582

Figure 1



585 **Figure 2: Early release of tissular damage and inflammatory markers in the different**
586 **groups.**

587 Blood concentrations of High Mobility Group Box 1 (HMGB1; Panel A), interleukin (IL)-6 (Panel
588 B), IL-1 β (Panel C) and IL-10 (Panel D) throughout the procedure, (n=5, 6 and 6 in Sham,
589 Control and TLV groups, respectively).

590 *Data are expressed as mean \pm sem. Statistical comparisons were only made between groups*
591 *but not among different time points; *, p<0.05 vs corresponding Sham; † p<0.05 vs*
592 *corresponding Control; TLV, total liquid ventilation, ROSC, resumption of spontaneous*
593 *circulation.*

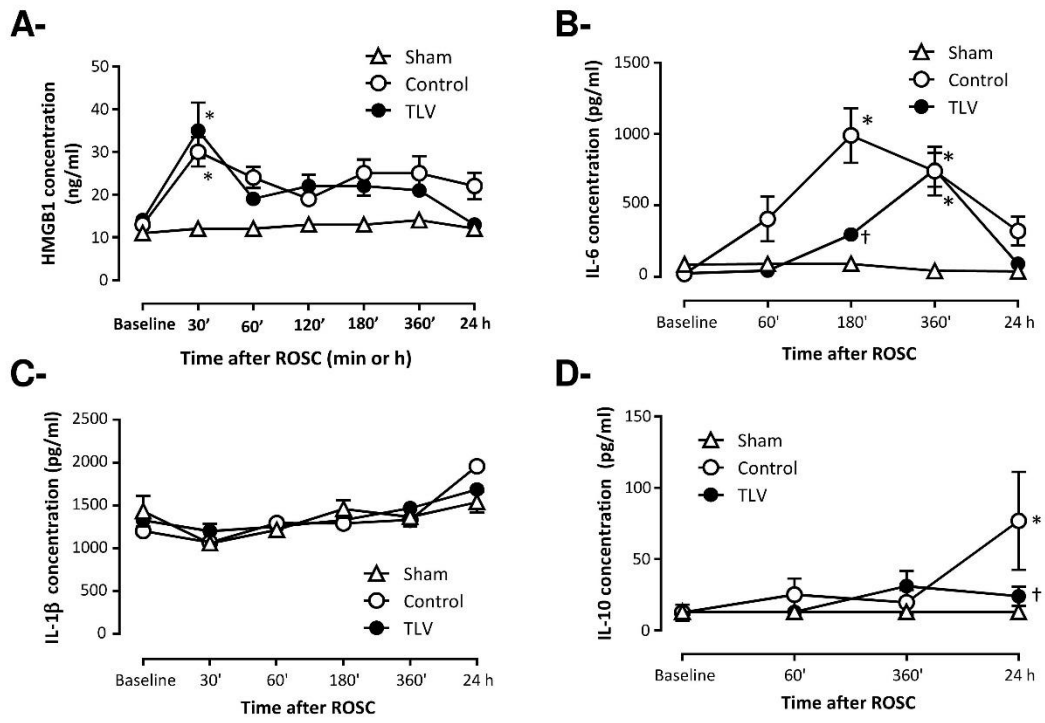
594

595

596

597

Figure 2



598 **Figure 3: Neurological dysfunction score and histopathological morphology.**

599 A- Neurological dysfunction at days 1 and 3 following resuscitation in the different experimental
600 groups (0% = lack of dysfunction; 100% = death). Circles represent individual values. Lines
601 represent mean values and corresponding standard error of the mean.

602 B- Kaplan-Meyer survival curves. All premature death in the Control group are related to
603 anticipated euthanasia for ethical considerations.

604 C- Number of degenerating neurons per field, as defined by positive Fluor Jade C cells.
605 Numbers are expressed as mean number per analyzed field, in parasagittal cortex and
606 hippocampus. Numbers are mean values from 5 field per rabbit and area.

607 D- Typical histological appearance of the cortex after Fluor Jade C staining, showing no or
608 very few degenerating neurons in Sham and TLV groups, as compared to frequent
609 degenerating neurons in Control group.

610 *Data are expressed as mean±sem. *, p<0.05 vs corresponding Sham; †, p<0.05 vs*
611 *corresponding Control; TLV, total liquid ventilation; n=5, 6 and 6 in Sham, Control and TLV*
612 *groups, respectively.*

613

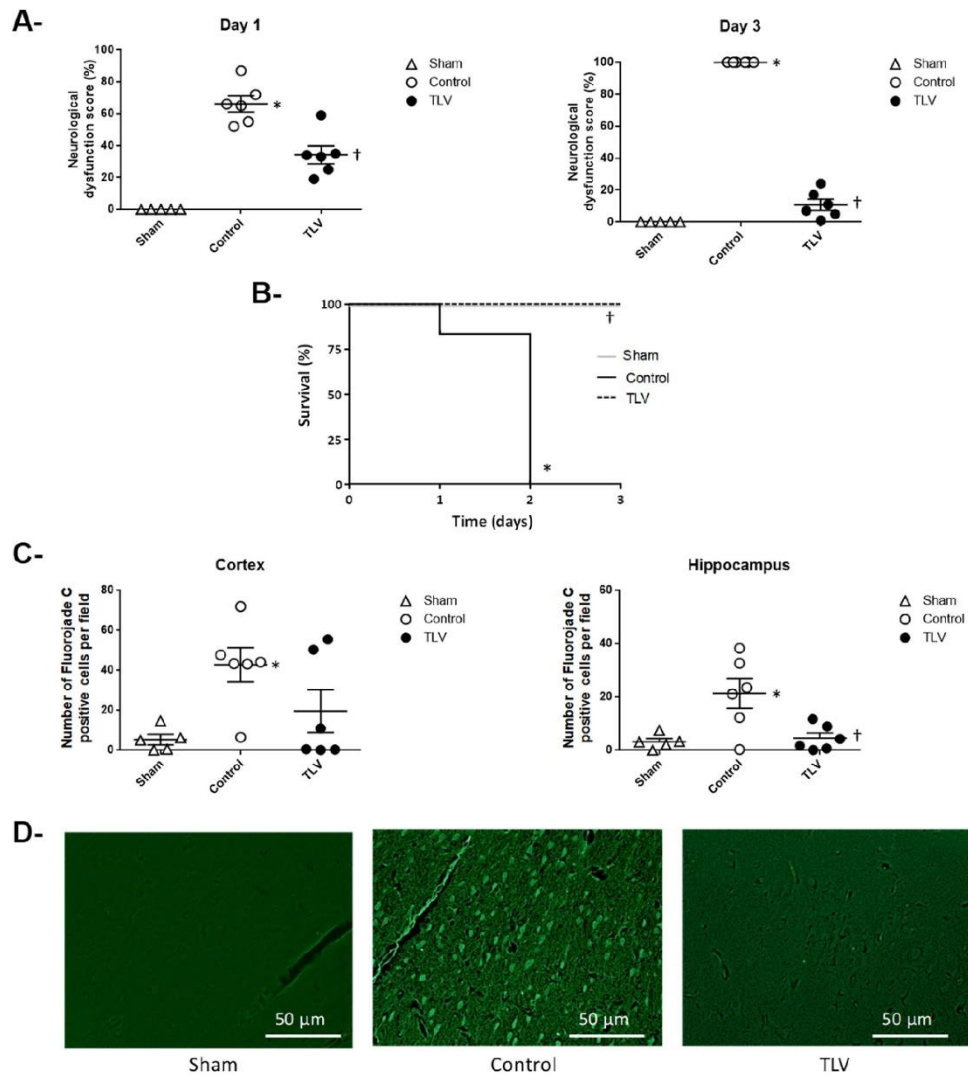
614

615

616

617

Figure 3



618 **Figure 4: Brain invasion by peripheral immune cells.**

619 A- Number of leukocytes (lymphocytes and neutrophils) localized into the cerebral parenchyma
620 in each group.

621 B-D- Morphological appearance of the immunohistochemical staining used for the leukocytes
622 identification. No positive cells were observed in sham animals (Panels B and C). In Control
623 and TLV groups, leukocytes (black arrows) were observed into the brain parenchyma close to
624 blood vessels (Panels D and E in a rabbit from the Control group).

625 *Data are expressed as mean±sem. *, p<0.05 vs corresponding Sham; †, p<0.05 vs*
626 *corresponding Control.*

627

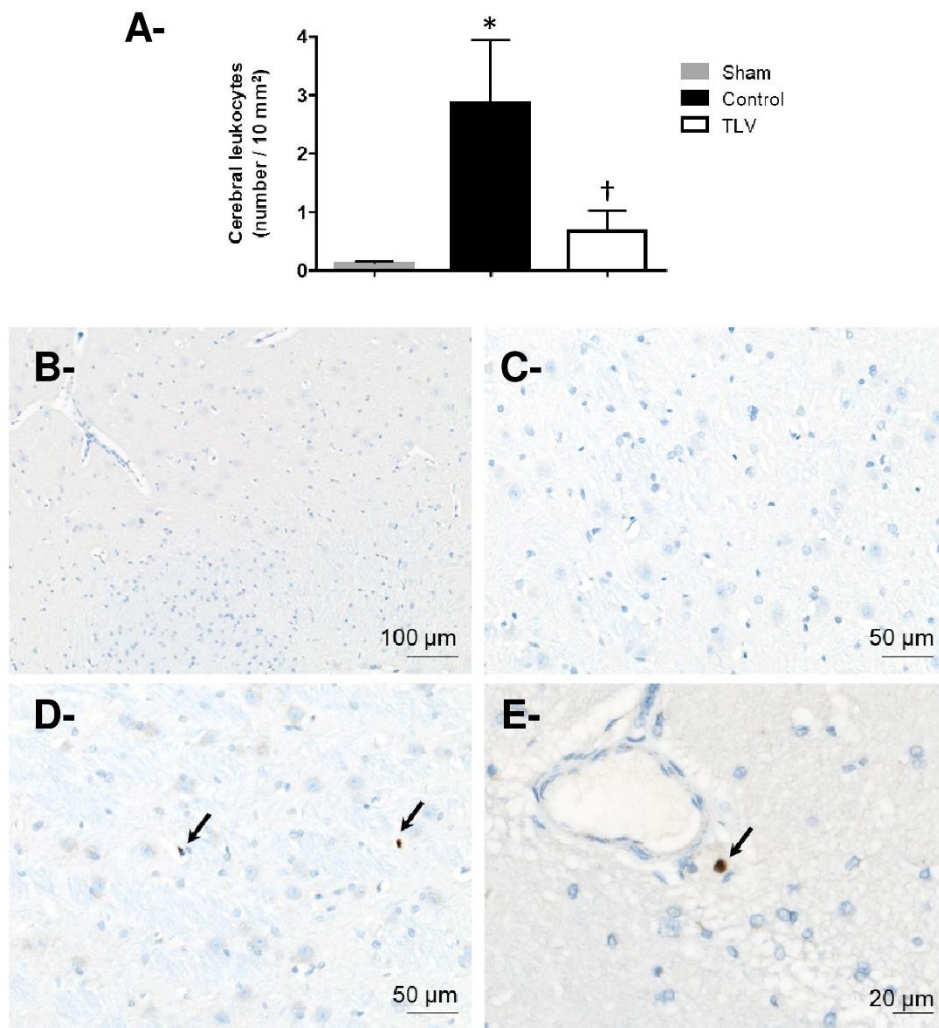
628

629

630

631

Figure 4



632 **Figure 5: Cytokine production by peripheral blood cells stimulated with**
633 **lipolysaccharide (LPS) at 33°C vs 38°C.**

634 Fresh whole blood from rabbits was incubated during 2 to 6 h after LPS adjunction.
635 Experiments were done at either 33°C and 38°C (n=6 for each condition). Interleukin (IL)-6,
636 *Data are expressed as mean±sem.* IL-1 β and Tumor Necrosis Factor (TNF)- α concentrations
637 were then measured in the plasma.

638 **, p<0.05 vs corresponding value at 33°C.*

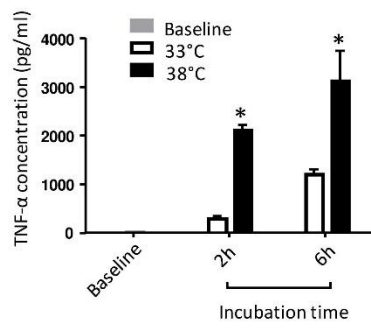
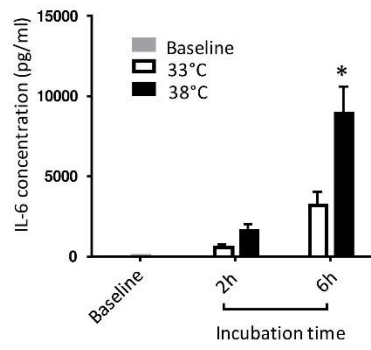
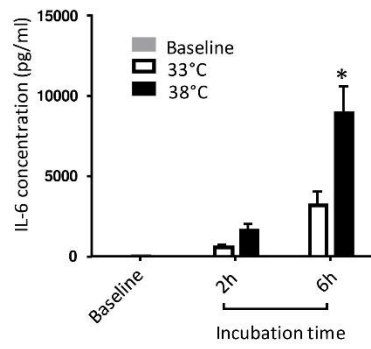
639

640

641

642

Figure 5



643

644

645 **Figure 6: Schematic representation of a putative mechanisms of protection of early**
646 **hypothermia induced by total liquid ventilation after cardiac arrest, with a focus on the**
647 **early inflammation reaction.**

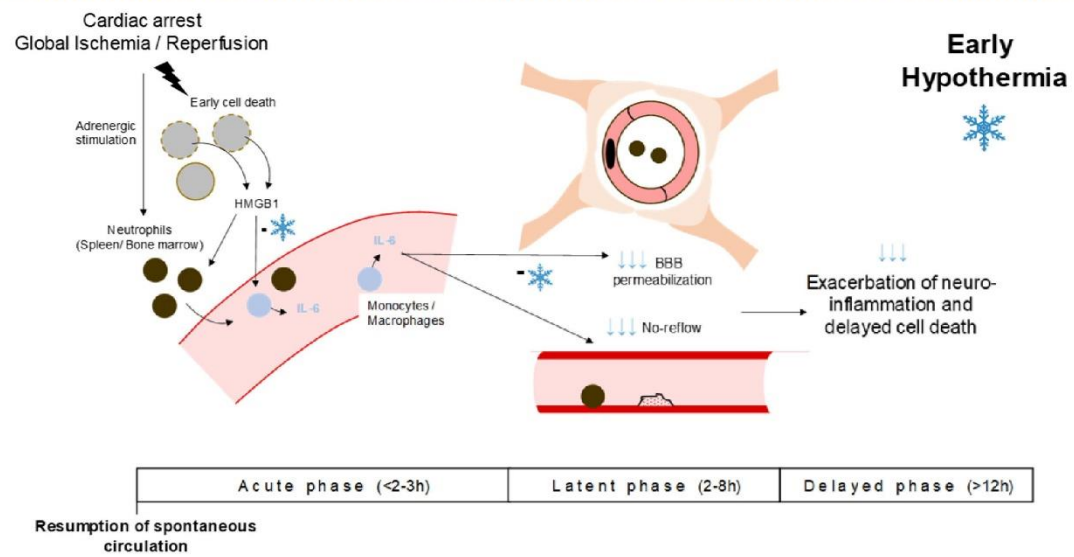
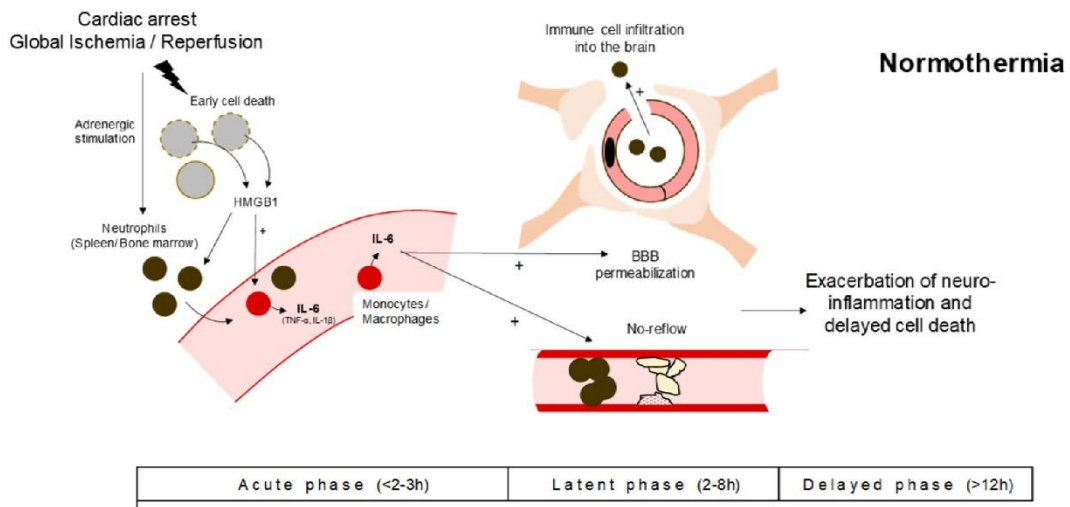
648 Beyond the results of the present study, the summarized assumptions are also based on
649 previous findings of our group and others. First, it was previously demonstrated that TLV
650 reduces the early permeabilization of the blood brain barrier (BBB) ⁸ and prevents the cerebral
651 hemodynamic disturbance ¹⁵. Second, the link between interleukin (IL)-6, BBB dysfunction and
652 no-reflow development has also been previously demonstrated in animal models of brain
653 ischemia ^{13,14}. Third, it is well shown that IL-6 secretion by immune cells is an immediate
654 response to danger signals such as high mobility group box 1 (HMGB1) that are released after
655 ischemic injury ³¹⁻³³. That is the reason why a global mechanistic hypothesis could be proposed
656 with a putative direct effect of early hypothermia on IL-6 secretion during the acute phase after
657 cardiac arrest, leading to a preservation of BBB dysfunction, no-reflow extension and
658 neurological lesions exacerbation.

659

660

661

Figure 6



662

663

664 **Supplemental material**

665

666 *Flow cytometry*

667 In the Control and TLV groups, 100 μ L of peripheral blood samples were collected
668 before the onset of cardiac arrest and at different time points throughout the procedure (i.e., 1
669 h, 3 h, 6 h and 24 h post-ROSC). Erythrocytes were lysed for 15 min, and the debris were
670 washed away, in accordance to the manufacturer recommendations (RBC Lysing Buffer,
671 Tebubio, Le Perray-en-Yvelines, France). Cells were then fixed in 0.5%
672 paraformaldehyde/PBS before staining the next day. Then, cells were incubated with Fcblock,
673 and stained using the following monoclonal antibodies: (APC)-labelled anti-T-cells marker
674 (KEN5, 5 μ L, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), phycoerythrin (PE)-labelled anti-
675 CD4 (0.75 μ L, Lifespan Biosciences, Seattle, USA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled
676 anti-CD8 (5 μ L, Lifespan Biosciences, Seattle, USA), APC-labelled anti-CD11b (clone M1/70,
677 1 μ L, EXBIO praha, Vestec, Czechoslovakia), FITC-labelled anti-CD14 : 5 μ L (Clone T \ddot{U} , 5 μ L,
678 Lifespan Biosciences, Seattle, USA), APC-labelled anti-CD79a (clone HM57, 5 μ L, EXBIO
679 praha, Vestec, Czechoslovakia). To perform surface antigen staining, cell suspensions were
680 incubated on ice with appropriate mix of antibodies for 30 min. Then, cells were washed three
681 times with a phosphate buffered saline solution containing bovine serum albumin (0.5%) and
682 finally resuspended in running buffer for flow cytometry. Intracellular staining with CD79-a, for
683 B-lymphocytes identification, was performed with Thermofisher Fix & Perm cell
684 permeabilization kit $\text{\textcircled{R}}$, according to the manufacturers instructions. Four-color flow cytometry
685 was conducted with the BD Biosciences AccuriC6 device.

686

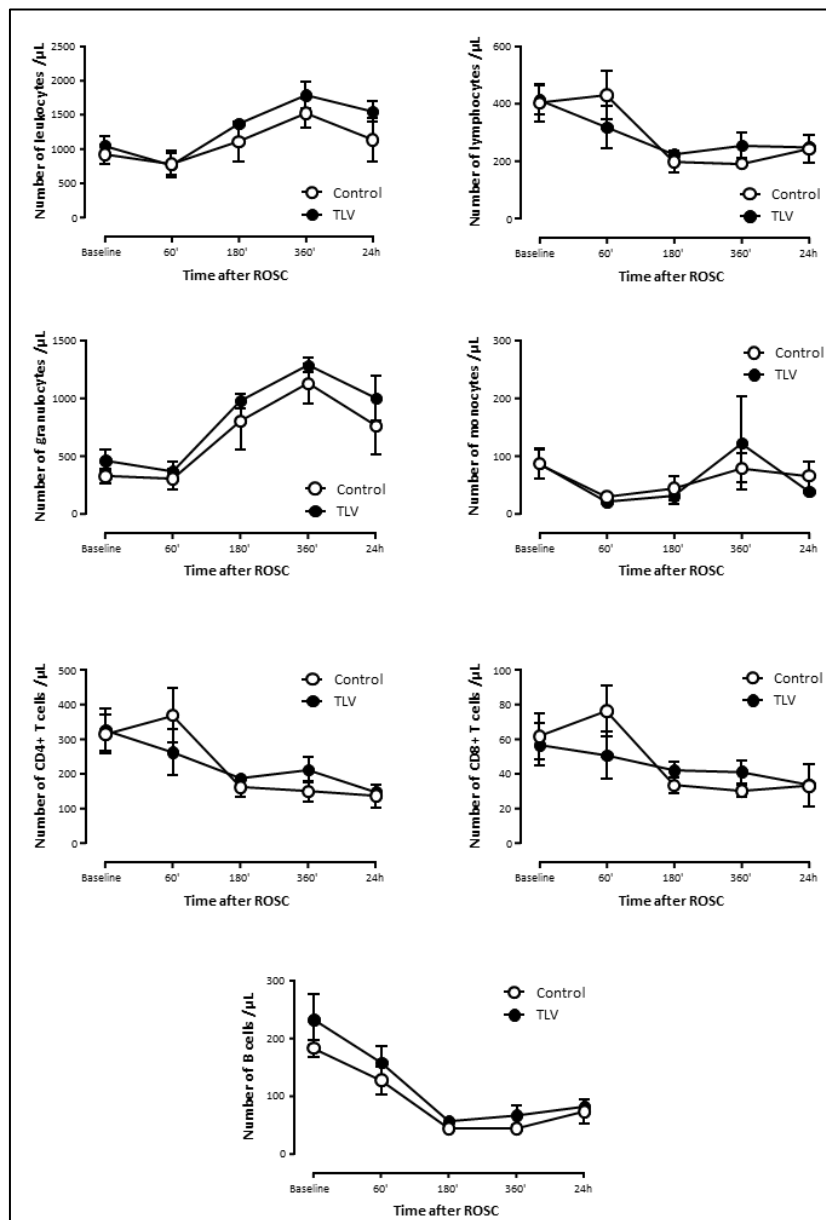
687

688 **Supplemental Figures**

689 **Figure 1: Leukocytes counts in the peripheral circulation throughout the experimental**
690 **protocol in the different groups.**

691 Granulocytes were considered as CD11⁺CD14⁻ cells, monocytes as CD11⁺CD14⁺ cells and B
692 cells as CD79a⁺ cells. T cells were identified thanks to a specific marker and further classified
693 as CD4⁺ or CD8⁺.

694 *Data are expressed as mean±sem. Statistical comparisons were only made between groups*
695 *but not among different time points; TLV, total liquid ventilation, ROSC, resumption of*
696 *spontaneous circulation.*



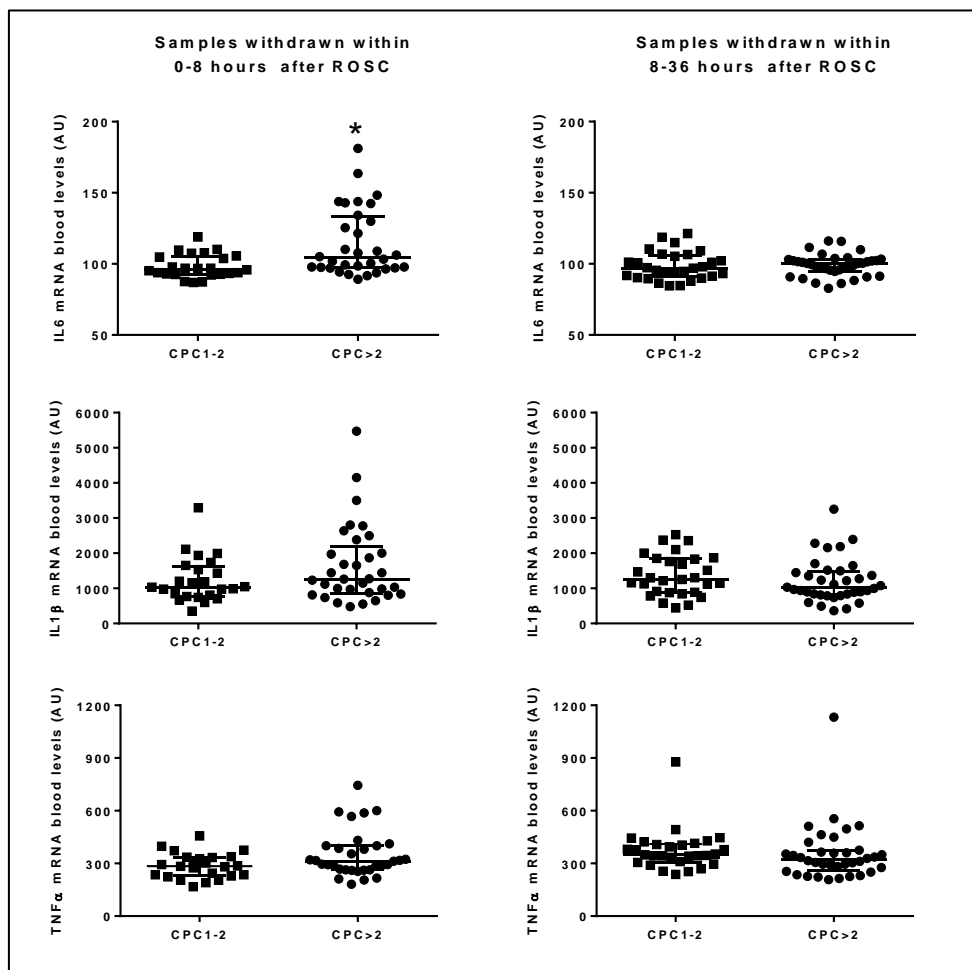
697

698 **Figure 2: Blood transcription level of interleukin (IL)-6, IL-1 β and Tumor Necrosis Factor**
699 **(TNF)- α in patients after out-of-hospital cardiac arrest.**

700 Transcription levels were analyzed in samples withdrawn within 0-8 h vs 8-36 h after cardiac
701 arrest (n=58 and 73, respectively). They were compared in patients with favorable vs poor
702 neurological outcome, *i.e.*, cerebral performance category (CPC)1-2 (n=25 and 33 for patients
703 sampled <8 h and between 8-30 hours, respectively) vs CPC>2 (n=28 and 35 patients sampled
704 <8 h and between 8-30 hours, respectively). Open circles and bold lines represent individual
705 and mean values, respectively.

706 *Data are expressed as individual (squares and circles), medians and interquartile values. *,*
707 *p<0.05 vs corresponding CPC 1-2.*

708



709

710

711 **Supplemental Tables**

712 **Table 1: Blood gases and biochemical parameters throughout protocol in the different**
 713 **groups.** Data are expressed as mean \pm SEM.

714 *Statistical comparisons were only made for group effect but not among time-points. *, p<0.05*
 715 *vs Sham; †, p<0.05 vs Control.*

716

Parameters and groups	Baseline	After ROSC		
		30 min	360 min	24 h
<u>Lactate blood level (mmol/L)</u>				
Sham	4.7 \pm 1.4	3.3 \pm 1.7	3.7 \pm 1.7	5.0 \pm 4.7
Control	5.7 \pm 1.4	15.7 \pm 1.4*	9.1 \pm 1.5*	5.6 \pm 2.2
TLV	4.3 \pm 0.7	16.9 \pm 1.0*	7.4 \pm 0.9	2.9 \pm 1.2
<u>Bicarbonate blood level (mmol/L)</u>				
Sham	28.4 \pm 3.3	26.2 \pm 1.6	27.0 \pm 1.6	21.2 \pm 1.9
Control	28.6 \pm 1.5	16.8 \pm 2.4*	20.5 \pm 2.9	21.2 \pm 2.0
TLV	27.4 \pm 2.1	21.6 \pm 1.4	20.8 \pm 1.8	26.1 \pm 3.0
<u>Creatinine blood level (μmol/L)</u>				
Sham	67 \pm 11	59 \pm 27	81 \pm 14	85 \pm 10
Control	62 \pm 12	158 \pm 53	107 \pm 39	136 \pm 45
TLV	53 \pm 8	121 \pm 39	82 \pm 8	88 \pm 23
<u>Glucose blood level (mg/dL)</u>				
Sham	1.8 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.1	1.7 \pm 0.1
Control	1.7 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1*	3.4 \pm 0.8*	1.7 \pm 0.2
TLV	2.0 \pm 0.1	4.1 \pm 0.3*	3.1 \pm 0.4*	1.3 \pm 0.1

717
 718

719

C. Étude du rôle de HMGB1 dans le syndrome post-arrêt cardiaque

Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation :

HMGB1 is a major contributor to post-cardiac arrest inflammatory syndrome and a relevant therapeutic target.

Boissady E., Kohlhauer M., Lidouren F., Hocini H., Ghaleh B., Tissier R.

Article non soumis

1 Introduction

Dans notre étude précédente, l'inhibition la réponse immune humorale au décours du syndrome post arrêt-cardiaque semblait être un des mécanismes d'action de la VLT, indépendamment de la réponse cellulaire associée. D'autres éléments sont en faveur du rôle de la réponse inflammatoire généralisée dans la physiopathologie de l'arrêt cardiaque et la propagation des dommages cérébraux. Des études cliniques mettent notamment en évidence l'existence d'une association entre la récupération neurologique des patients et les concentrations sanguines de certains médiateurs inflammatoires systémiques après la réanimation [74, 86].

Dans cette troisième étude notre objectif était donc de déterminer si la modulation directe de l'inflammation, en jouant sur les signaux libérés au décours de la mortaliété cellulaire, était suffisante pour induire une protection dans notre modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez le lapin. Les DAMPs sont en effets connus pour être de puissants médiateurs pro-inflammatoires et sont libérés très en amont dans la chaîne de réaction aboutissant au syndrome sepsis-like. Ils contribuent ensuite à entretenir la stimulation immunitaire. Leur inhibition constitue donc *a priori* une stratégie anti-inflammatoire puissante après l'arrêt cardiaque. HMGB1, un DAMP nucléaire ubiquitaire, semble notamment être un activateur majeur de l'immunité innée lors d'ischémie-cérébrale. Son inhibition dans des modèles rongeurs est associée à une puissante réduction de la neuro-inflammation [304, 305, 102]. De plus, il a été montré qu'HMGB1 est libéré rapidement par les tissus au décours de l'arrêt cardiaque. Une augmentation des taux circulant peut-être mise en évidence chez les patients dès leur admission à l'hôpital, et ces derniers sont d'ailleurs associés à l'intensité de la réponse inflammatoire systémique qu'ils développent [3]. Ce DAMP constitue donc une cible thérapeutique privilégiée pour évaluer la pertinence de l'inhibition de la réponse inflammatoire au décours de l'arrêt cardiaque.

Nous avons donc évalué les effets d'une inhibition pharmacologique de HMGB1 sur la survie et la récupération neurologique des animaux après un arrêt cardiaque. Pour cela, nous avons traité les animaux avec de la glycyrrhizine, un agent pharmacologique se liant directement à HMGB1 pour inhiber son activité. La pharmacologie de cet inhibiteur est

en effet relativement bien connue et présente également l'avantage de ne nécessiter aucun développement spécifique pour une utilisation chez le lapin.

2 Protocole expérimental

Étude de survie, pronostic neurologique et de la réponse inflammatoire

Nous avons utilisé le modèle d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire chez le lapin, tel que précédemment décrit. Des animaux ont également été soumis à une procédure Sham et ont été anesthésiés et ventilés selon les mêmes modalités, sans induction préalable d'un arrêt cardiaque. Après la RACS, les lapins soumis à un arrêt cardiaque ont été répartis aléatoirement en deux groupes distincts. Le groupe GLY a reçu une administration intraveineuse de glycyrrhizine (4 mg/kg), 5 min après l'arrêt cardiaque, tandis que les animaux du groupe Témoin ont reçu un même volume de solvant (NaCl 0,9% ; Figure 51). Après 6 h de ventilation mécanique, les animaux ont été réveillés et remis en cage. Ils ont ensuite été suivis pendant 3 jours afin d'évaluer quotidiennement leur fonction neurologique. A l'issue de cette période les animaux ont été euthanasiés et leur cerveau prélevé pour la réalisation d'analyses histologiques. Des prélèvements sanguins ont également été effectués tout au long du protocole pour évaluer les concentrations de marqueurs inflammatoires ainsi que les populations de leucocytes périphériques, selon la méthode décrite précédemment.

Étude de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Des animaux supplémentaires ont été soumis à la même procédure expérimentale afin d'étudier la perméabilité de la BHE. Après leur répartition aléatoire dans les groupes Témoin et GLY, les animaux ont reçu une administration de bleu Evans 30 min après la RACS. Deux heures plus tard, les lapins ont été euthanasiés et leurs cerveaux prélevés afin d'être analysés selon la méthode décrite précédemment, afin d'évaluer la diffusion du bleu Evans à travers la BHE.

Étude de la neuro-inflammation et de l'infiltration du cerveau par les cellules immunitaires périphériques

Une dernière série d'animaux a été soumise au même protocole d'arrêt cardiaque et au même traitement afin de quantifier l'infiltration du parenchyme par les leucocytes d'origine sanguine. Pour cela, les animaux ont été euthanasiés 2 ou 6 h après la RACS et un hémisphère cérébral a été prélevé et préparé pour la réalisation d'une cytométrie en flux selon la méthode décrite précédemment. Par ailleurs, l'autre hémisphère cérébral et le cœur ont également été prélevés, congelés à l'azote liquide puis conservés à -80°C pour la réalisation ultérieure d'analyses transcriptomiques. L'objectif était d'étudier l'activation de voies de l'immunité innée au sein de ces tissus dans les différents groupes.

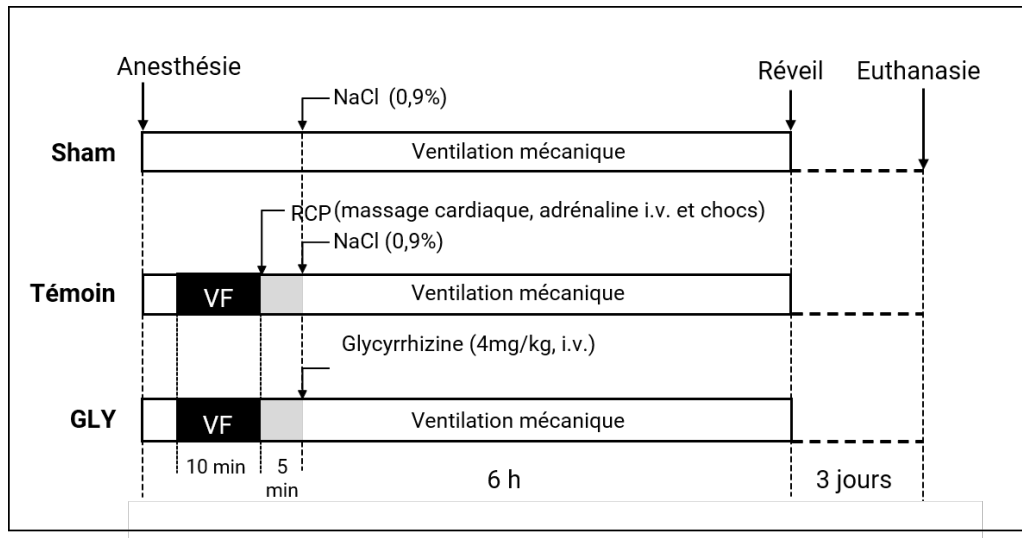


Figure 51: Protocole expérimental.

RCP, réanimation cardio-pulmonaire ; FV, fibrillation ventriculaire

3 Résultats

Effectifs et paramètres hémodynamiques

Parmi les 29 animaux soumis à un arrêt cardiaque, 20 lapins ont pu être réanimés avec succès et inclus dans les différents groupes expérimentaux, à raison de 10 lapins par groupe. Les temps moyens de réanimation étaient respectivement de $2,8 \pm 0,1$, et $3,0 \pm 0,1$ min, dans les groupes Témoin et GLY, respectivement. Par ailleurs, 7 animaux ont été soumis à la procédure Sham.

Au décours de l'arrêt cardiaque, les valeurs de la pression artérielle moyenne étaient similaires entre les groupes. Néanmoins, les animaux du groupe GLY ont nécessité des quantités plus faibles d'adrénaline que le groupe Témoin pour maintenir une pression artérielle moyenne à 70 mmHg tout au long du suivi. Ainsi, les animaux du groupe GLY ont reçu une quantité totale d'adrénaline de 153 ± 27 $\mu\text{g}/\text{kg}$ contre 352 ± 61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ dans le groupe Témoin. Par ailleurs, les animaux du groupe GLY, après avoir fait l'objet d'une élévation similaire de la concentration sanguine en lactates par rapport aux animaux témoins, ont présenté une décroissance plus rapide au cours du temps de ce paramètre. Ainsi, 360 min après la réanimation la lactatémie était de $4,2 \pm 0,7$ mmol/L vs $9,3 \pm 1,0$ mmol/L et $4,0 \pm 1,1$ mmol/L dans les groupes GLY, Témoin et Sham, respectivement (Figure 52). Le même phénomène a été observé concernant l'évolution de la glycémie et du pH avec une normalisation plus rapide au décours de l'arrêt cardiaque dans le groupe GLY. Ces résultats suggèrent que la glycyrrhizine exerce un effet cardioprotecteur et améliore la perfusion systémique.

Réponse inflammatoire systémique

Dans notre étude, l'administration de glycyrrhizine était également associée à une réduction des taux circulants en HMGB1 tout au long de la procédure, indiquant probablement

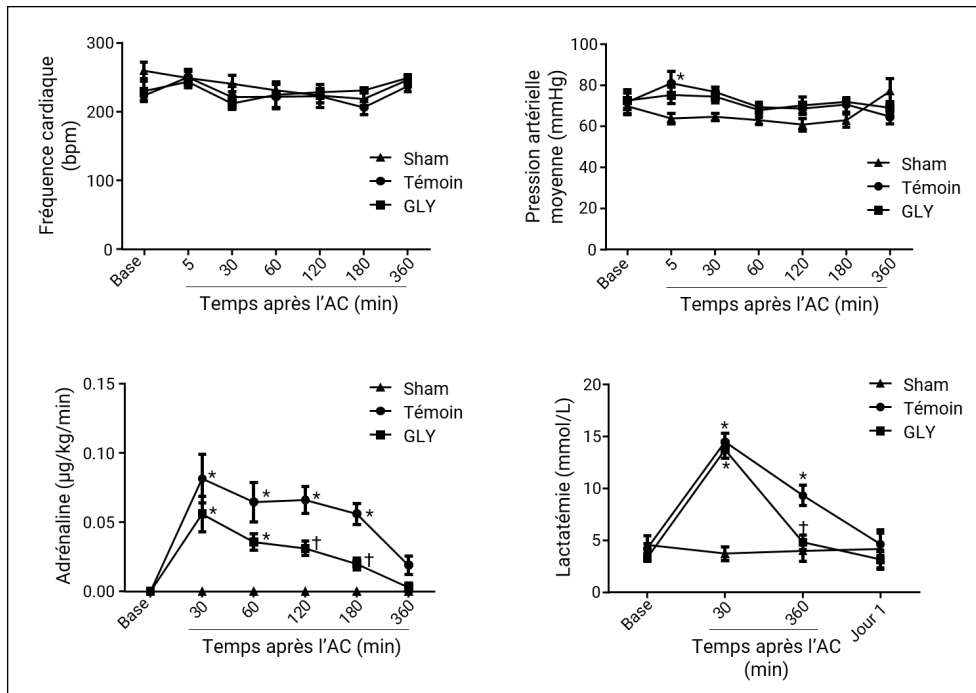


Figure 52: Paramètres hémodynamiques et évolution de la lactatémie au cours du suivi dans les différents groupes expérimentaux.

AC, arrêt cardiaque; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

une inhibition du relargage actif de ce DAMP (voire de la mort cellulaire). De même, une augmentation précoce des concentrations en IL-6 a été observée chez les animaux témoins, avec un maximum atteint 3 h après la réanimation. Les concentrations de cette cytokine pro-inflammatoire étaient considérablement réduites dans le groupe GLY, avec des valeurs comparables à celles des animaux Sham, tout au long de la procédure (Figure 53). Par exemple, 3 h après l'arrêt cardiaque la concentration sanguine en IL-6 chez les lapins du groupe GLY était de 231 ± 218 ng/ml, contre respectivement 993 ± 471 et 182 ± 58 ng/ml dans les groupes Témoin et Sham. La glycyrrhizine semble donc bien exercer un puissant effet anti-inflammatoire en inhibant la sécrétion systémique de médiateurs pro-inflammatoires. L'administration de glycyrrhizine était également associée à une atténuation de la réponse anti-inflammatoire compensatrice. En effet, 24 h après l'arrêt cardiaque, le groupe Témoin a fait l'objet d'une augmentation des niveaux plasmatiques d'IL-10. Cette élévation était bloquée dans le groupe GLY, ce qui confirme l'importance de HMGB1 comme médiateur du syndrome sepsis-like au décours de l'arrêt cardiaque.

Tout comme dans l'étude précédente, une leucocytose sous-tendue par un recrutement massif de granulocytes dans la circulation a été observée dans le groupe Témoin au cours des premières 24 h suivant l'arrêt cardiaque. Comme illustré par la Figure 53, la glycyrrhizine était sans effet sur cette réponse et l'évolution du ratio lymphocytes/ neutrophile était notamment similaire entre les deux groupes. Ces flux de cellules immunitaires dans la circulation semblent donc indépendants de la signalisation médiée par HMGB1.

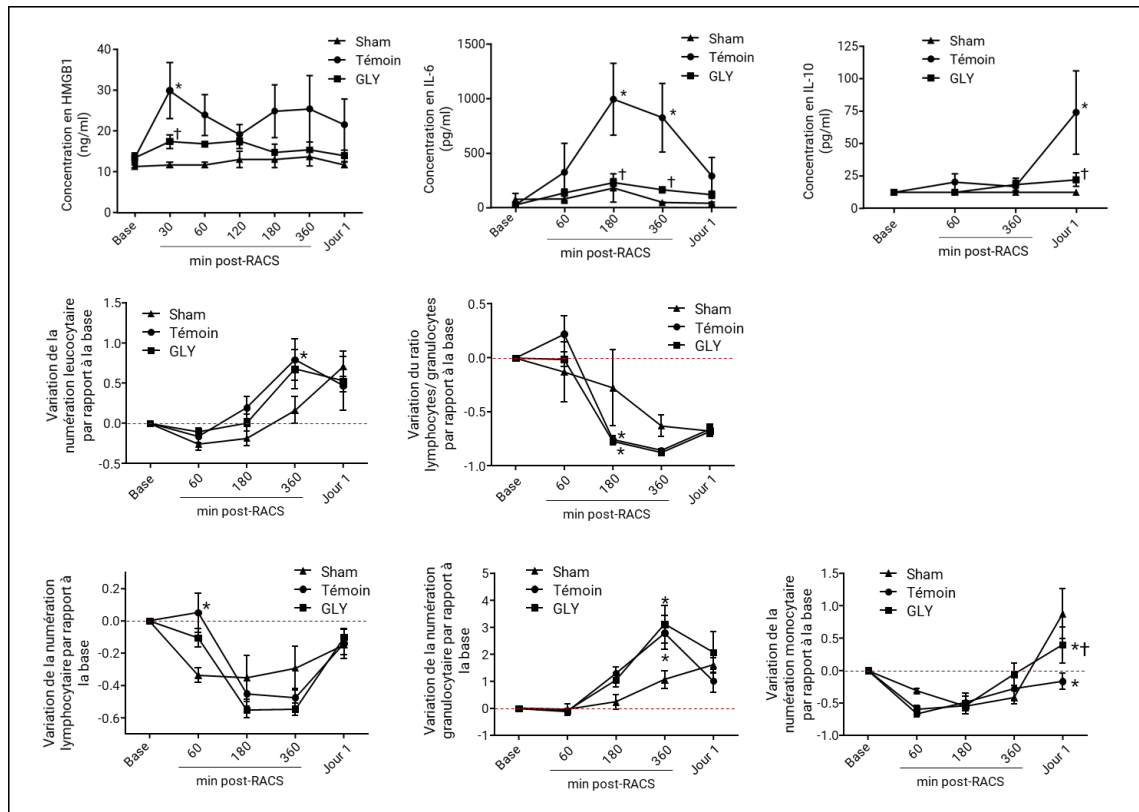


Figure 53: Marqueurs humoraux et cellulaires de la réponse immunitaire post-arrêt cardiaque.

Évolution des concentrations en High Mobility Group Box 1 (HMGB1), Interleukine (IL)-6 et IL10 au cours du suivi dans les différents groupes expérimentaux (A). Numérations leucocytaires dans la circulation sanguine au cours du suivi (B). Les granulocytes ont été identifiés par un marquage CD11⁺CD14⁻, les monocytes par un marquage CD11⁺CD14⁺, les lymphocytes B comme des cellules CD79a⁺ et enfin les lymphocytes T ont été identifiés grâce à un marqueur dédié, puis classifiés en CD4⁺ ou CD8⁺. Les résultats sont exprimés en variation par rapport à la valeur initiale (pré-arrêt).

AC, arrêt cardiaque; *, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

Récupération neurologique et lésions cérébrales

Une amélioration de la fonction neurologique a été observée dans le groupe GLY par rapport au groupe Témoin. La différence entre les groupe était significative au 3ème jour de suivi après l'arrêt cardiaque (Figure 54). Le groupe GLY présentait alors un score de dysfonction neurologique moyen de $58 \pm 13\%$ contre 100% dans le groupe témoin, du fait de la mortalité dans ce groupe. En effet, tous les lapins du groupe Témoin ont fait l'objet d'une euthanasie anticipée pour cause éthique (troubles neurologiques sévères) alors que 4 lapins sur 6 dans le groupe GLY ont survécu jusqu'au terme du protocole.

Une réduction de l'atteinte neuronale a également été observée à l'examen histologique dans le groupe GLY. Comme illustré par la Figure 54, les animaux ayant reçu de la glycyrrhizine présentaient moins de neurones positifs au Fluorochrome C que ceux du groupe Témoin (79 ± 13 vs 37 ± 9 /champs respectivement dans les groupes GLY et Témoin).

La réduction des lésions cérébrales chez les animaux du groupe GLY était associée à une diminution de la concentration intra-cérébrale en leucocytes d'origine périphérique par rapport au groupe Témoin, traduisant une moindre infiltration inflammatoire de l'encéphale chez ces animaux.

Réponse inflammatoire locale et infiltration des cellules immunitaires circulantes dans le parenchyme cérébral

Des expériences supplémentaires ont été conduites afin d'évaluer la précocité du passage intra-cérébrale des cellules immunitaire recrutées dans la circulation sanguine et de préciser l'effet de la glycyrrhizine sur la capacité de migration de ces cellules. Pour cela, des animaux ont été soumis à la même procédure d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire décrite précédemment et euthanasiés 2 h (GLY H2 ; T H2) ou 6 h (GLY H6 ; T H6) après la réanimation afin de pouvoir soumettre le tissu cérébral à une cytométrie en flux, après extraction des cellules immunitaires ($n = 5$ dans chaque groupe).

Après l'arrêt cardiaque, nous avons observé une baisse progressive du rendement cellulaire global au cours du temps, qui semblait principalement attribuable à une diminution de la quantité de cellules microgliales collectées. Par exemple, les animaux Sham présentaient en moyenne 693 ± 101 cellules/ μL de tissu analysé contre 365 ± 77 et 197 ± 48 cellules/ μL dans les groupes T H2 et TH6 (Figure 55). Ce résultat pourrait refléter une fragilisation des cellules cérébrales ou bien une mortalité précoce des cellules microgliales activées. De plus, comme illustré par la Figure 55, les animaux Témoins ont présenté une élévation significative de la proportion de lymphocytes T et de granulocytes parmi les cellules cérébrales, à partir de 6 h après l'arrêt cardiaque. De façon surprenante, l'administration de glycyrrhizine était associée à une inhibition sélective de l'infiltration des lymphocytes T dans le cerveau ($2,7 \pm 0,3$ vs $7,3 \pm 2,6\%$ de lymphocytes dans les groupes GLY H6 et T H6, respectivement), mais était sans effet sur l'influx de granulocytes. Même si cet effet semblait concerner de façon majoritaire les lymphocytes T CD8⁺, une tendance à la baisse de la proportion des lymphocytes T CD4⁺ était également présente.

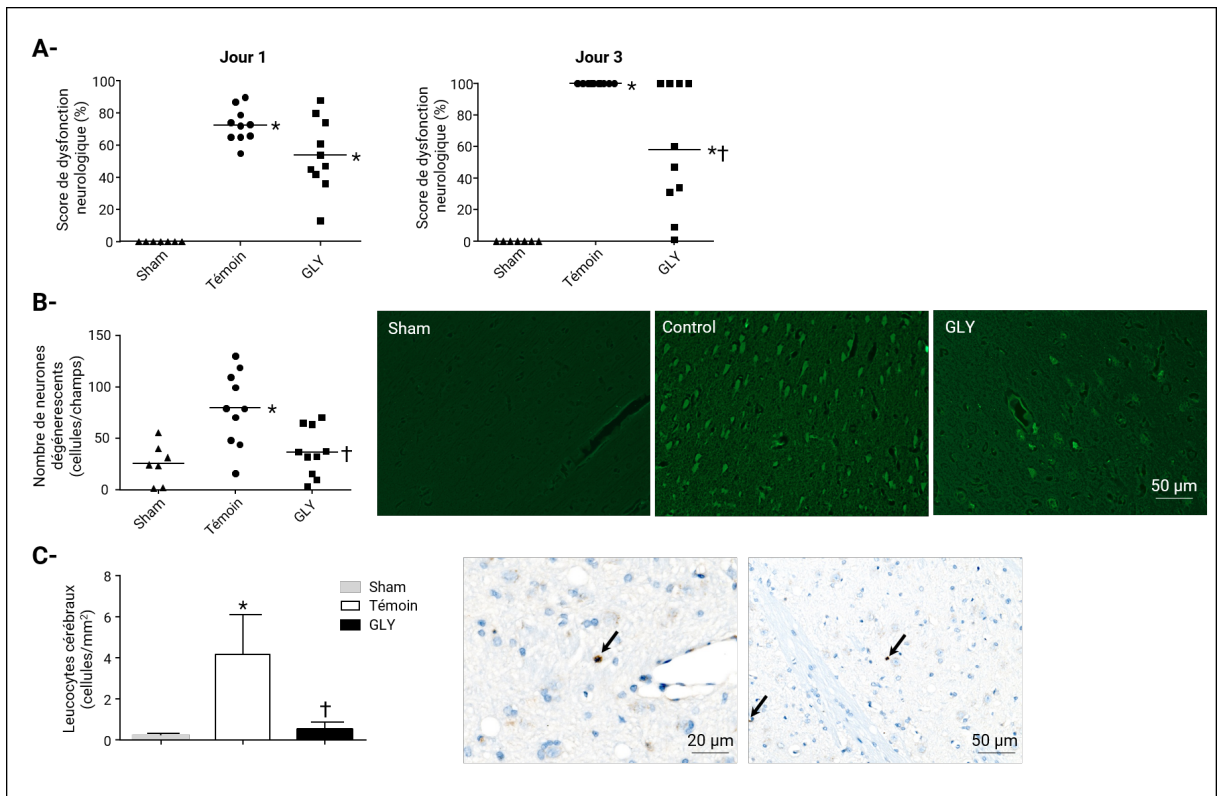


Figure 54: Scores neurologiques mesurés au premier et au dernier jour de suivi (A). Les cercles représentent les scores individuels et les traits représentent la moyenne de chaque groupe. Quantité de neurones dégénérésents dans le cortex et l'hippocampe, correspondant au nombre moyen de neurones positifs au fluorojade C par champ analysé (B). Les cercles représentent les moyennes individuelles et les traits la moyenne de chaque groupe. Aspect histologique d'une zone représentative de l'hippocampe colorée au fluorojade C dans les différents groupes expérimentaux (C).

***, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; \dagger , $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoïn

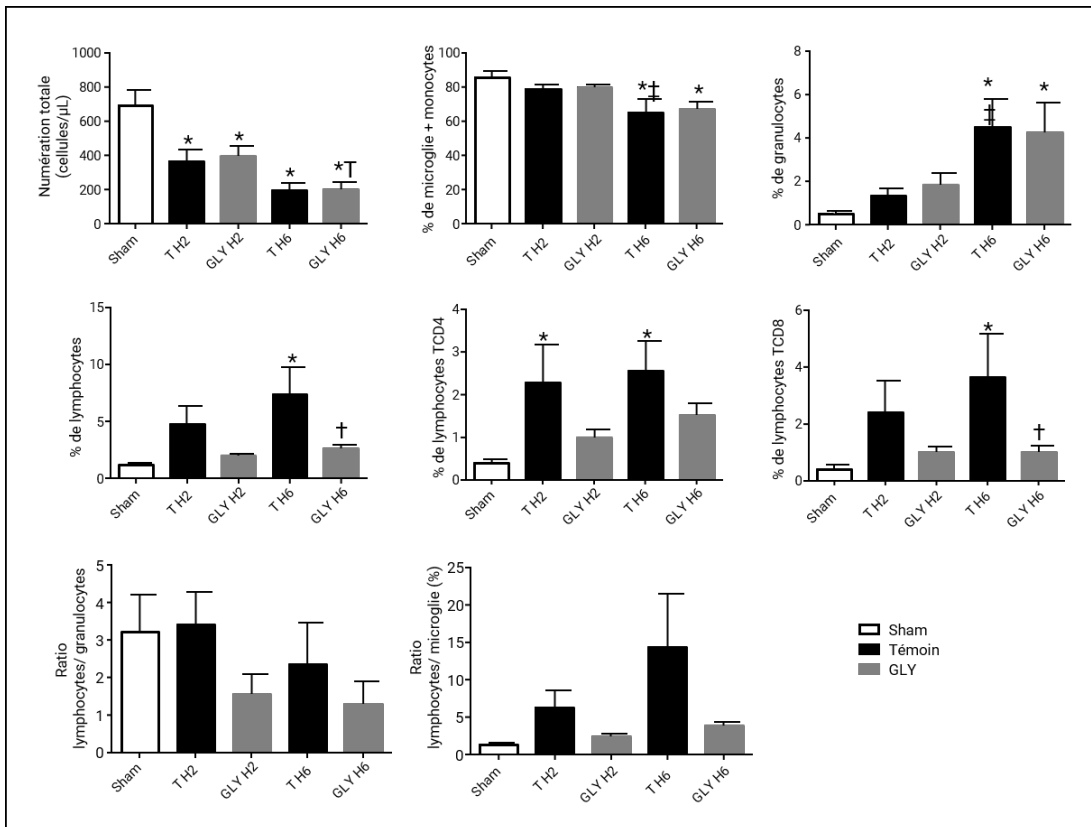


Figure 55: Neuro-inflammation d'origine locale et systémique évaluée à 2 et 6 h après l'arrêt cardiaque.

Quantification des cellules inflammatoires cérébrales avant (Sham), et 2 h (GLY H2, CT H2) et 6 h après l'arrêt cardiaque (GLY H6, CT H6) (A). Les cellules microgliales et les monocytes (CD11b+, SSClow) ont été distingués des granulocytes (CD11+, SSChigh) sur la base de leur granulosité. Les lymphocytes T ont été identifiées grâce à un marqueur dédié, puis classifiées en CD4⁺ ou CD8⁺. Marquage immuno-histochimique des lymphocytes et granulocytes dans le cerveau (B). Marquage des cellules phagocytaires (cellules immunitaires résidentes) activées grâce à un anticorps CD68⁺ (C).

*, $p < 0,05$ par rapport au groupe Sham; †, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

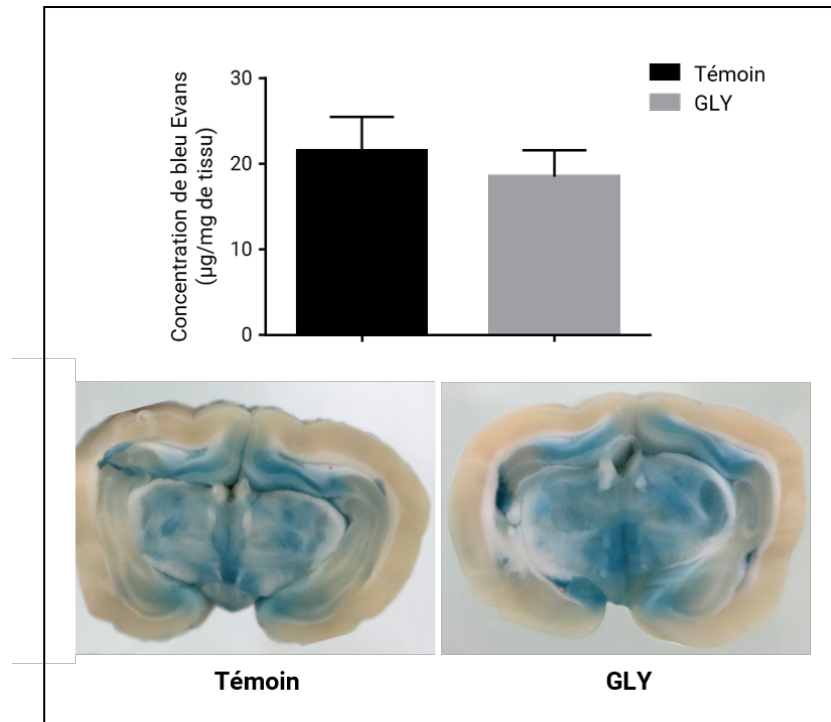


Figure 56: Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique au bleu Evans évaluée après l'arrêt cardiaque. Quantité de bleu Evans ayant marqué le tissu cérébral au cours des 2 heures suivant l'arrêt cardiaque (A) et photographies de coupes de cerveau représentatives des différents groupes (B).
BHE, barrière hémato-encéphalique

Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique

Nous avons évalué la perméabilité de la BHE au bleu Evans pendant les deux premières heures suivant l'arrêt cardiaque chez des animaux supplémentaires (n=4 par groupe). Comme l'illustre la Figure 56, les animaux du groupe Témoin présentaient une perméabilité très importante de la BHE au bleu Evans après l'arrêt cardiaque, essentiellement localisée dans les régions les plus centrales de l'encéphale comme l'hippocampe. L'administration de glycyrrhizine était sans effet sur l'ouverture de la BHE, comme l'indique les niveaux comparables de bleu Evans dans le tissu cérébral des groupes GLY et Témoin. Ainsi la prévention du passage des lymphocytes dans le cerveau chez les animaux GLY semble reposer sur un effet purement chémoattracteur de HMGB1.

Confirmation du rôle de HMGB1 dans les effets neuroprotecteurs de la glycyrrhizine

La glycyrrhizine étant connue pour exercer des effets pleïotropes, nous avons souhaité vérifier que la prévention de la dysfonction neurologique mise en évidence dans notre étude provenait bien de son action inhibitrice de la HMGB1. Pour cela, nous avons évalué les effets d'une autre stratégie d'inhibition de ce DAMP par le FPS-ZM1, un inhibiteur spécifique de RAGE. RAGE est en effet un des principaux récepteurs de l'immunité innée activé par la HMGB1, médiant son activité inflammatoire.

Dans cette dernière série expérimentale, les animaux ont été soumis à la même procédure d'arrêt cardiaque par fibrillation ventriculaire et de suivi post-réanimation, présentée plus haut. Après l'arrêt cardiaque, les lapins ont ainsi été suivi durant 5 h à l'état anesthésié en conditions normothermes avant d'être réveillés pour évaluer leur fonction neurologique sur une période de 3 jours. À l'issue de la réanimation, les animaux ont été répartis aléatoirement entre deux groupes: un groupe Témoin (administration de NaCl, n=4) et un groupe FPS (n=4), dans lequel les animaux recevaient une administration de FPS (1 mg/kg, i.v) 5 min après la RACS.

Comme illustré par la Figure 57, les animaux traités par le FPS-ZM1 présentaient une meilleure récupération neurologique que les animaux du groupe Témoin. Néanmoins, la différence de score de dysfonction neurologique entre les groupes n'était significative qu'au premier jour de suivi (45 ± 8 vs $78 \pm 10\%$ chez les FPS vs Témoins), ce qui peut notamment s'expliquer par les faibles effectifs utilisés pour ce protocole. L'amélioration de la fonction neurocomportementale était associée à une diminution du nombre de neurones dégénérescents dans le groupe FPS comme indiqué par les résultat du marquage par le Fluorojade C. Cette deuxième stratégie d'inhibition de HMGB1, ciblée sur une de ces voies de signalisation semble donc bien produire des effets neuroprotecteurs similaires à ceux obtenus avec la glycyrrhizine.

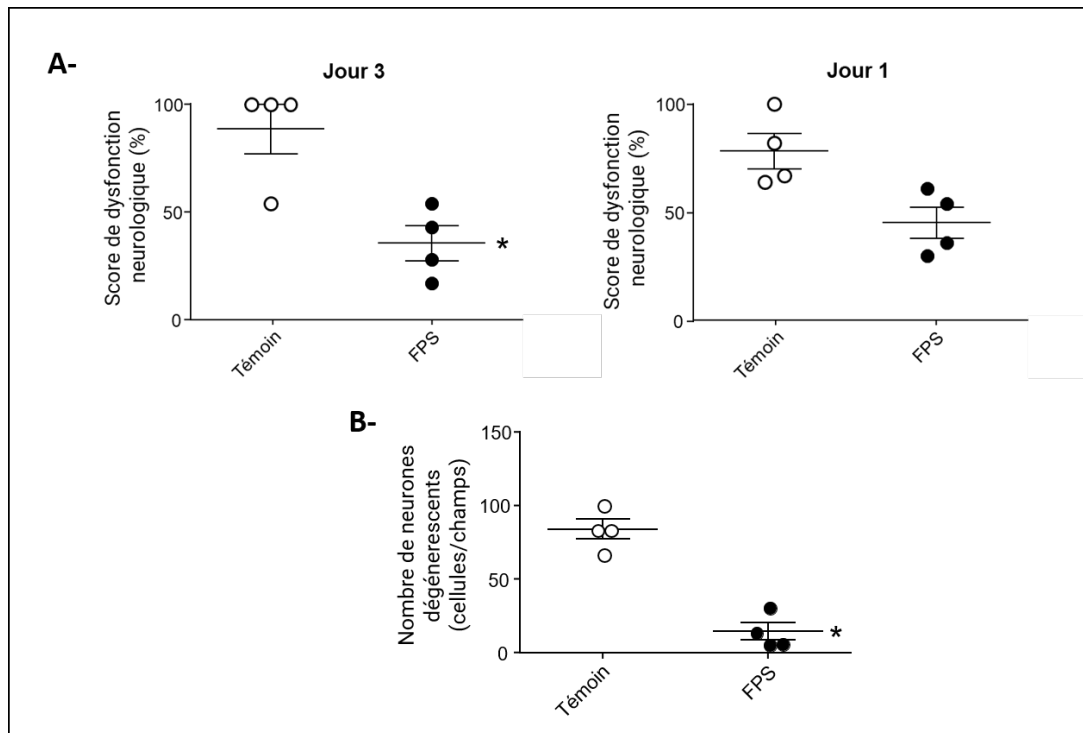


Figure 57: Évaluation de l'effet neuroprotecteur de l'antagonisation du récepteur RAGE par le FPS-ZM1. Scores neurologiques mesurés au premier et au dernier jour de suivi (A). Les cercles représentent les scores individuels et les traits représentent la médiane de chaque groupe. Quantité de neurones dégénérés dans le cortex et l'hippocampe, correspondant au nombre moyen de neurones positifs au fluorojade C par champ analysé (B). Les cercles représentent les moyennes individuelles et les traits la moyenne de chaque groupe.
*, $p < 0,05$ par rapport au groupe Témoin

Chapitre 3

Discussion générale

L'objectif général de mon travail de thèse était d'évaluer le rôle de l'activation immunitaire et inflammatoire précoce dans le mécanisme d'action de la VLT au décours de l'arrêt cardiaque. Pour cela, nous avons investigué l'effet de la VLT sur la réponse humorale et cellulaire qui survient dans les premières heures suivant la réanimation dans un modèle d'arrêt cardiaque choquable. Par la suite, nous avons étudié l'effet d'un inhibiteur direct de HMGB1.

Au cours de la première étude, nous avons déterminé les paramètres ventilatoires les plus adaptés à la réalisation d'une ventilation liquidienne. Il n'existait en effet pas de consensus sur les valeurs de volume et pression de remplissage, de volume courant de PFC ou encore de fréquence respiratoire permettant de limiter la survenue de volo- ou de baro-trauma. Or, la compressibilité des liquides étant beaucoup plus faible que celle des gaz, le risque de distension excessive des alvéoles et de "ventilator-induced lung injury" (VILI) est plus important lors de ventilation liquidienne. Les précédentes applications cliniques de la ventilation liquide ont d'ailleurs souligné la nécessité de contrôler précisément les volumes de PFC utilisés, d'autant plus dans des conditions où les poumons sont déjà fragilisés. Par exemple, les essais cliniques menés sur la PLV dans le SDRA de l'adulte rapportent une augmentation du taux de pneumothorax et d'épisodes hypoxiques chez les patients traités [209]. Ces résultats suggèrent la survenue de baro-traumas secondaires à un remplissage inadapté des poumons et ont pu interférer avec les bénéfices de la procédure. Par ailleurs, la plupart des études expérimentales sur la VLT ont été conduites avec des volumes relativement élevés, par rapport à ce qui est pratiqué en VMC (> 20 ml/kg), de manière à assurer un remplissage complet des poumons et abolir l'interface air-poumon. Le volume résiduel utilisé est en effet généralement situé aux alentours de 25 à 30 ml/kg et le volume courant entre 15 à 20 ml/kg [290, 202], pouvant même monter jusqu'à 25-30 ml/kg [212, 306] dans certaines études. Par ailleurs, du fait de la difficulté à gérer le débit expiratoire pour limiter la survenue de collapsus trachéaux, des fréquences relativement basses étaient associées, entre 3 à 8 cycles/min.

Dans notre étude il s'est avéré que l'utilisation de faibles volumes, contrairement à ce qui était jusqu'alors préconisé, permettait de maintenir des échanges gazeux corrects tout en préservant l'intégrité du parenchyme pulmonaire. Au contraire, les animaux ventilés avec

des volumes plus élevés ont présenté une dégradation de leur fonction ventilatoire ainsi que des dommages de la barrière alvéolo-capillaire à l'histologie. Par ailleurs, la diminution des volumes de PFC n'altérerait pas le potentiel de refroidissement de la procédure. Par exemple dans l'étude princeps de Forman *et al.*, la vitesse de refroidissement de la température rectale d'agneaux ventilés avec des PFC à 20°C était de 8.4°C/h contre 10 à 15°C/h chez les porcelets dans notre étude. Nous avons ainsi proposé un nouveau paradigme de VLT, dans lequel le poumon doit être ventilé "sous la CRF", *i.e.*, dans lequel il ne doit être rempli que partiellement avec des PFC afin de conserver des zones de réserve susceptibles d'être recrutées, et nous avons montré que cette nouvelle modalité de VLT garantissait une meilleure protection du parenchyme vis-à-vis du VILI. Ces observations faites sur des modèles animaux de petite taille ont été par la suite confirmées chez des porcs adultes ainsi que des primates non-humains afin de valider la transposabilité de cette modalité de ventilation chez l'homme. Nous avons également montré que cette approche de VLT pouvait être appliquée sans risque à des poumons susceptibles d'être altérés au décours d'un arrêt cardiaque, et que les bénéfices précédemment objectivés par le laboratoire dans des modèles d'arrêt cardiaque adulte étaient bien conservés. De jeunes porcelets soumis à un arrêt cardiaque mimant un épisode d'anoxo-ischémie néonatale et traités par VLT hypothermisante présentaient en effet une meilleure récupération neurologique que des animaux non refroidis. Ces résultats pourraient relancer l'intérêt de la VLT en pédiatrie. Dans ce contexte l'encéphalopathie anoxo-ischémique est en effet fréquemment associée à une aspiration méconiale. Ainsi, la combinaison de la rapidité d'induction de l'hypothermie après la réanimation des nourrissons pour les protéger des séquelles neurologiques et du lavage des poumons par les PFC pourrait constituer un réel atout par rapport aux traitements actuellement disponibles en clinique.

Une fois ces premiers points clés de la stratégie de VLT établis, nous avons étudié le mécanisme d'action d'une hypothermie induite très rapidement par VLT dans la scène identifiée comme la plus pertinente en vue du transfert clinique de cette technologie, l'arrêt cardiaque.

Nous avons ainsi montré qu'une partie de la neuroprotection médiée par la VLT hypothermisante au décours de l'arrêt cardiaque semblait reposer sur un effet anti-inflammatoire, comme indiqué par la réduction des concentrations circulantes d'IL-6 dans les heures suivant la réanimation par rapport aux animaux Témoins. De même, nous avons observé une atténuation de la réponse anti-inflammatoire compensatrice chez les animaux traités par VLT, caractérisée par une élévation des concentrations en IL-10. Il s'agit d'une manifestation fréquemment décrite dans les jours suivant l'arrêt cardiaque, similaire à l'évolution des patients lors de sepsis. Nos résultats semblaient ainsi traduire une atténuation de l'ensemble de la perturbation immunitaire post-arrêt cardiaque. Si ces résultats sont en adéquation avec une précédente étude du laboratoire qui a montré que les animaux traités par VLT présentaient une atténuation du syndrome sepsis-like, ils semblent contredire les observations cliniques. Dans l'étude de Bro-Jeppesen *et al.*, les investigateurs ont par exemple conclu que l'hypothermie thérapeutique était sans effet sur la réponse inflammatoire systémique, et en particulier sur l'élévation des concentrations en IL-6. Cette divergence, tout comme celle concernant l'intensité des effets neuroprotecteurs, pourrait s'expliquer par la différence

de rapidité d'induction de l'hypothermie entre notre protocole et ce qui est actuellement fait en clinique. Ainsi, l'action anti-inflammatoire de l'hypothermie serait une des clés de compréhension de sa fenêtre thérapeutique et expliquerait en partie la perte de bénéfice observée lorsque son induction est retardée après la réanimation.

Nous avons cherché à identifier plus précisément les mécanismes sous-jacents. Contrairement à notre hypothèse initiale, l'effet anti-inflammatoire de la VLT n'était apparemment pas associé à une inhibition du relargage de DAMPs et de la signalisation immunitaire. Une élévation comparable des concentrations de HMGB1 et PS100B a été mise en évidence dans nos groupes expérimentaux. L'hypothermie semble plutôt agir par inhibition directe de la réactivité des cellules inflammatoires circulantes sans modifier leur recrutement dans le compartiment sanguin. Ce dernier résultat issu d'un protocole de cytométrie en flux sur sang total remet notamment en question l'utilisation du ratio lymphocyte/neutrophile très utilisé en clinique comme biomarqueur pronostic. Ce ratio était en effet similaire entre nos groupes VLT et Témoin, malgré une amélioration très marquée de la récupération du pronostic neurologique dans le groupe VLT. La mobilisation des neutrophiles et la lymphopénie consécutives à l'arrêt apparaissent ainsi principalement comme des conséquences de la purge surrénalienne, et reflèteraient la sévérité de l'hypoxo-ischémie tissulaire initiale. De plus, de façon tout à fait inattendue, il semblerait que l'inhibition transitoire de l'IL-6 durant une courte période après la réanimation serait suffisante pour stopper les conséquences tardives du syndrome inflammatoire, *i.e.*, la propagation des lésions neuronales. Au cours du réchauffement les niveaux plasmatiques d'IL-6 du groupe VLT ont en effet retrouvé des valeurs similaires à celles des animaux témoins. D'un point de vue physiopathologique, cela pourrait s'expliquer par l'induction d'une tolérance durant une période de stimuli inflammatoires excessifs. Néanmoins, si nous avons identifié des hypothèses mécanistiques permettant de faire le lien entre la réduction de signalisation IL-6 et la prévention des dommages neuronaux, synthétisées dans la Figure 58, le rôle causal de l'IL-6 dans le mécanisme d'action de la VLT n'a pas été confirmé dans cette étude. L'existence d'une corrélation positive entre les concentrations précoces d'IL-6 et le pronostic neurologique chez les patients que nous avons étudié semble également en faveur de cette hypothèse. De même, notre protocole expérimental ne nous a pas permis de déterminer si l'augmentation des concentrations en IL-6 6 h après l'arrêt cardiaque n'était pas une conséquence active de notre modalité de réchauffement, plutôt qu'un effet transitoire de l'hypothermie. Notre étude permet *a minima* de conclure avec certitude que la procédure de VLT n'induit pas de réponse inflammatoire propre, confirmant ainsi son innocuité.

Afin d'investiguer davantage le rôle des événements inflammatoires précoces dans la physiopathologie du syndrome post-arrêt cardiaque, nous avons choisi de mener une étude complémentaire visant à évaluer l'effet de la glycyrrhizine dans ce contexte. Nous avons en effet souhaité déterminer si la HMGB1 extracellulaire contribuait au développement des lésions cérébrales, bien que sa libération ne semble pas constituer une cible d'action de la VLT.

Nous avons ainsi montré que l'inhibition ciblée de HMGB1 par la glycyrrhizine ou de l'une de ses principales voies de signalisation par le récepteur RAGE, était suffisante pour induire

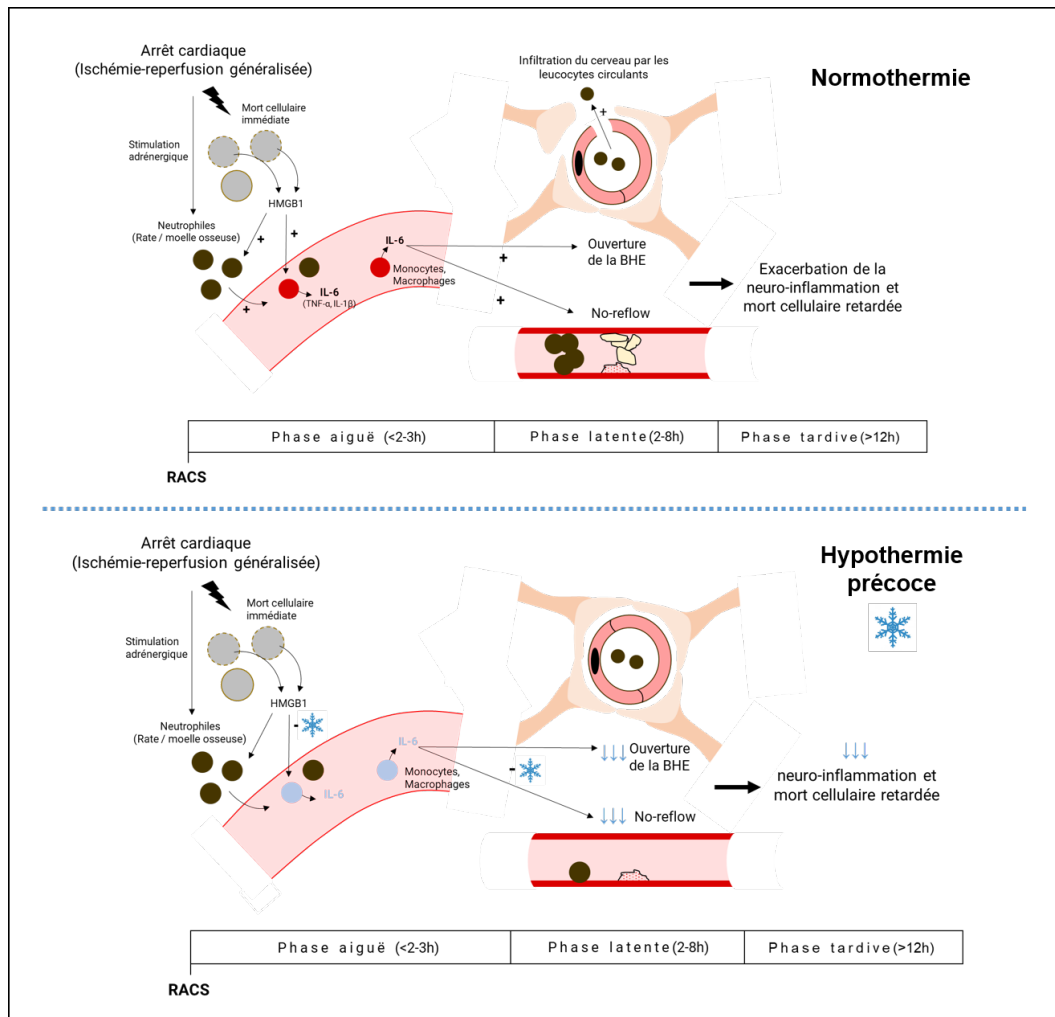


Figure 58: Représentation schématique des effets anti-inflammatoires de l'hypothermie ultra-précoce induite par ventilation liquide totale au décours d'un arrêt cardiaque et voies mécanistiques supposées à l'origine des bénéfiques neuroprotecteurs.

Les hypothèses présentées ici concernant le lien entre neuroprotection et réduction des concentrations sanguines en interleukine (IL)-6 sont basées sur des travaux antérieurs du laboratoire d'accueil ainsi que sur des études menées par des équipes extérieures. Il a en effet été montré que l'hypothermie induite par VLT prévenait la perméabilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) [10] ainsi que les désordres hémodynamiques cérébraux dans les premières heures suivant l'arrêt cardiaque [307]. De plus, des études réalisées dans des modèles d'ischémie cérébrale ont mis en évidence un lien entre les concentrations en IL-6, l'altération de la BHE et l'intensité des phénomènes de no-reflow [257, 299]. Nous proposons ainsi un modèle dans lequel une partie des effets neuroprotecteurs de la VLT proviennent d'une réduction de la signalisation par l'IL-6, via notamment une préservation de la BHE et une réduction du no-reflow cérébral.

des effets neuroprotecteurs après un arrêt cardiaque. L'effet neuroprotecteur de cette inhibition avait déjà été décrit par d'autres équipes dans des modèles d'arrêt choquable et non choquable chez le rat [115, 287]. Néanmoins, les modalités mécanistiques de cette protection étaient encore relativement méconnues. Les deux études susmentionnées se sont notamment limitées à l'étude d'un blocage de l'activité de HMGB1 à l'échelle cérébrale. Il a ainsi été proposé que la HMGB1 libérée par les cellules nerveuses à l'issue de l'ischémie-reperfusion stimulait les réponses microgliale et astrocytaire, exacerbant la production de cytokines pro-inflammatoires et la neuro-inflammation. Aucune étude ne s'était donc encore intéressée à l'effet de l'inhibition de la HMGB1 sur le syndrome inflammatoire systémique post-arrêt cardiaque.

Dans cette troisième étude nous avons mis en évidence que l'inhibition de la HMGB1 était associée à une suppression quasi-complète de la production d'IL-6 dans la circulation sanguine. Ces résultats témoignent d'une part de l'importance de la HMGB1 dans l'initiation d'un syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaque et conforte, d'autre part, la contribution de cette réponse aux séquelles neurologiques, préalablement suspectée dans notre étude sur la VLT. Cependant, une des principales faiblesses de nos travaux réside dans l'absence de la démonstration de la nature causale de ce lien entre la réponse inflammatoire et la dysfonction neurologique. La complexité de la réponse inflammatoire, reposant sur des myriades de processus interdépendants, rend ce type d'investigation particulièrement difficile à mettre en œuvre d'un point de vue méthodologique. Une alternative pour obtenir des premiers éléments de réponses, serait de se limiter au blocage de l'IL-6, que nous avons identifié comme étant un de ses principaux médiateurs en post-arrêt cardiaque et d'évaluer l'effet de cette intervention sur la récupération neurologique des animaux dans notre modèle. Néanmoins, de tels travaux constituent un sujet d'étude à part entière dans la mesure où il faudrait préalablement valider une stratégie d'inhibition de la cytokine chez le lapin. Il n'existe dans la littérature aucune molécule décrite pour cet usage dans cette espèce. Par ailleurs, un essai clinique est actuellement en cours pour tester l'effet du Tocilizumab (un anticorps anti-IL-6R) dans l'arrêt cardiaque choquable.

Dans notre étude, le traitement par la glycyrrhizine était également associé à une baisse de l'infiltration précoce du cerveau par les lymphocytes T. Il pourrait s'agir d'une des voies par lesquelles cette substance module l'environnement neuro-inflammatoire. D'autres études expérimentales sont en effet en faveur d'une implication précoce de lymphocytes dans la propagation des lésions d'ischémie-reperfusion au cours du syndrome post-arrêt cardiaque. Nos résultats, montrant une tendance d'augmentation du nombre de lymphocytes infiltrant dès 2h après la réanimation, sont notamment en accord avec l'étude menée par Deng *et al.* [129] sur un modèle de 6 min de *no-flow* chez la souris. Ces derniers ont en effet mis en évidence une infiltration cérébrale par les lymphocytes dès 3 h après l'arrêt cardiaque, persistant jusqu'à 3 jours après, avec une prédominance des lymphocytes TCD4 dans l'infiltrat. D'autres études réalisées dans des modèles d'ischémie cérébrale régionale corroborent la rapidité de l'influx des lymphocytes dans le cerveau, ainsi que leur rôle dans la propagation des lésions neuronales [130, 131]. De multiples travaux ont par exemple montré que les souris déficientes en lymphocytes présentaient des infarctus significativement moins volumineux que des souris de phénotype sauvage [135, 244, 308, 309]. Hurn *et al.*

[135] ont notamment décrit une diminution de 40% de la taille d'infarctus chez des souris SCID ("Severe Combined Immunodeficiency", déficientes à la fois en lymphocytes T et B) soumises à 90 min d'ischémie cérébrale focale et 22 h de reperfusion par rapport à des animaux Témoins. D'autres résultats semblent indiquer que la protection est spécifiquement médiée par la déficience en lymphocytes T dans ce contexte. En effet, des expériences de transplantation de lymphocytes B fonctionnels chez des souris $Rag1^{-/-}$ ne modifiaient pas la protection conférée par la mutation génétique préalablement mise en évidence chez ces animaux, contrairement à la transplantation de cellules $CD3^{+}$ [244, 308, 309]. De même la déficience en RANTES (CCL5), une chimiokine impliquée dans le recrutement des lymphocytes T sur les sites inflammatoires [310], confère également une protection vis-à-vis du développement de l'infarctus. Les lymphocytes T apparaissent donc comme des médiateurs essentiels des dommages au cours de la phase aiguë de l'AVC et pourrait exercer un rôle similaire au décours de l'arrêt cardiaque.

Contrairement à l'hypothermie qui semble protéger l'encéphale des agressions extérieures en préservant la BHE et en maintenant ainsi l'immunoprivilège cérébral, la glycyrrhizine semble plutôt agir sur la capacité migratoire des lymphocytes T. Cette stratégie de modulation pharmacologique de l'activité de la HMGB1 semble donc tout à fait complémentaire de la VLT. En agissant sur des cibles différentes de celles de la VLT, elle permettrait de compléter sa protection, tout en étant administrée plus précocement, dès la RACS. Des expériences doivent désormais être menées afin d'évaluer l'effet d'une inhibition spécifique des lymphocytes T au cours du syndrome post-arrêt cardiaque, pour confirmer leur rôle dans le mécanisme d'action de la glycyrrhizine.

Un autre constat qui émerge de cette série d'étude concerne l'existence d'évènements inflammatoires très précoces (activation immunitaire, ouverture de la BHE, sécrétion d'IL-6, infiltration des lymphocytes T dans le cerveau) survenant au cours des premières heures suivant la réanimation, susceptibles de conditionner le pronostic neurologique, au moins à court terme. L'ensemble de nos résultats sont ainsi en faveur d'une fenêtre thérapeutique très étroite pour la prise en charge du syndrome post-arrêt cardiaque, qui devra être prise en compte lors de la définition des futures conditions d'application de la VLT en clinique. D'autant plus qu'une sous-analyse des données de l'étude PRINCESS a très récemment confirmé que les patients dont le refroidissement était initié moins de 20 min après le début de l'arrêt cardiaque présentaient une meilleure récupération neurologique que les patients dont le refroidissement était initié plus tardivement, dans le sous-groupe des arrêts cardiaques avec un rythme initialement choquable [311]. Or, dans cette étude, le refroidissement, assuré par une méthode vasculaire (évaporation trans-nasale de PFC), est beaucoup plus lent que celui qui pourrait être obtenu avec la VLT. Au-delà du timing d'inclusion des patients, la gravité initiale de l'arrêt cardiaque est également susceptible d'influencer l'efficacité de l'hypothermie induite par VLT. En ce sens, Callaway *et al.* viennent de publier les résultats d'une étude réalisée sur une cohorte de 1319 patients victimes d'un arrêt cardiaque catégorisés selon la sévérité estimée de leur atteinte initiale [312]. Parmi le sous-groupe des patients n'ayant pas développé œdème cérébral sévère ou une altération trop importante de l'EEG, les auteurs ont montré qu'une hypothermie modérée à 33°C prodiguait une

protection plus importante qu'un CCT à 36°C chez les patients les plus sévèrement atteints. Au contraire, le CCT à 36°C s'avérait plus efficace chez les patients présentant une atteinte légère à modérée. En revanche, dans le groupe des patients les plus sévères (EEG trop altéré ou œdème cérébral sévère), les deux stratégies de refroidissement corporel étaient sans effet. Il pourrait donc être pertinent de ne traiter par VLT que les patients ayant souffert d'un certain seuil de dommages d'afin d'optimiser le bénéfice de la procédure. Pour cela, des paramètres de neuropronostication relativement simples mais efficaces, comme la durée du *no-flow* et du *low-flow*, pourraient être utilisées afin de trier rapidement les patients.

Les voies de modulation du syndrome inflammatoire post-arrêt cardiaques apparaissent donc multiples, mais elles partagent un même potentiel neuroprotecteur lorsqu'elles sont appliquées précocément après la RACS.

Conclusion

Les différentes études conduites au cours de ma thèse nous ont permis de d'apprécier l'activation de l'immunité innée et de la réponse inflammatoire au cours de la phase précoce du syndrome post-arrêt cardiaque, en lien avec la survenue des dommages cérébraux. Nous avons pu proposer des bases mécanistiques de la protection médiée par l'hypothermie induite par VLT ainsi qu'une nouvelle approche anti-inflammatoire par l'inhibition directe de HMGB1.

Au cours de la première étude nous avons défini les conditions d'application optimales de la VLT, à l'aide d'un prototype de ventilateur à piston permettant un contrôle en pression et en volume de la procédure. Nous avons démontré la faisabilité d'une VLT à « bas-volume » et confirmé que cette modalité permettait d'assurer un refroidissement corporel optimal tout en préservant l'intégrité des poumons. Au cours de la deuxième étude nous avons montré que la neuroprotection assurée par cette stratégie de refroidissement ultra-rapide était associée à une modulation transitoire de la réponse inflammatoire humorale au décours de l'arrêt cardiaque. Contrairement à notre hypothèse initiale, cet effet anti-inflammatoire ne reposait pas sur une protection vis-à-vis de la mortalité cellulaire précoce, survenant immédiatement après la reperfusion, et de la signalisation pro-inflammatoire concomitante médiée par les DAMPs. Il s'est avéré que l'hypothermie agissait en modulant directement l'activité sécrétoire des leucocytes circulants, dont l'intensité est fortement dépendante de la température. Notre hypothèse est ainsi qu'une hypothermie courte et instaurée très précocement après l'arrêt cardiaque assure une partie de ses effets neuroprotecteurs en prévenant la stimulation excessive de l'immunité innée qui a lieu durant une période de susceptibilité particulière de l'encéphale (désordres hémodynamiques, dysfonction de la BHE...). Enfin, au cours de la troisième étude nous avons montré que la modulation directe de HMGB1, un DAMP dont le rôle dans la propagation des lésions d'ischémie-reperfusion cérébrale est désormais bien caractérisé, permettait également de réduire les dommages neuronaux au décours de l'arrêt cardiaque. HMGB1 semble en effet non seulement promouvoir la réponse inflammatoire systémique mais favorise également la neuro-inflammation à travers une chémo-attraction cérébrale ciblée sur les lymphocytes. L'inhibition de cette molécule constitue donc une cible pertinente pour limiter le syndrome post-arrêt cardiaque et compléter l'action de l'hypothermie. Dans cette optique, l'inhibiteur que nous avons utilisé, la glycyrrhizine, offre un potentiel de transfert clinique intéressant et justifiant des explorations complémentaires.

Bibliographie

- [1] G. Luc, V. Baert, J. Escutnaire, M. Genin, *et al.*, “Epidemiology of out-of-hospital cardiac arrest: A French national incidence and mid-term survival rate study,” *Anaesthesia Critical Care & Pain Medicine*, vol. 38, pp. 131–135, Apr. 2019.
- [2] T. Omura, S. Kushimoto, S. Yamanouchi, D. Kudo, *et al.*, “High-mobility group box 1 is associated with neurological outcome in patients with post-cardiac arrest syndrome after out-of-hospital cardiac arrest,” *Journal of Intensive Care*, vol. 4, May 2016.
- [3] A. Sugita, K. Kinoshita, A. Sakurai, N. Chiba, *et al.*, “Systemic impact on secondary brain aggravation due to ischemia/reperfusion injury in post-cardiac arrest syndrome: a prospective observational study using high-mobility group box 1 protein,” *Critical Care*, vol. 21, Sept. 2017.
- [4] M. Jastremski, K. Sutton-Tyrrell, P. Vaagenes, N. Abramson, *et al.*, “Glucocorticoid Treatment Does Not Improve Neurological Recovery Following Cardiac Arrest,” *JAMA*, vol. 262, pp. 3427–3430, Dec. 1989.
- [5] N. Nielsen, J. Wetterslev, T. Cronberg, D. Erlinge, *et al.*, “Targeted temperature management at 33°C versus 36°C after cardiac arrest,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 369, pp. 2197–2206, Dec. 2013.
- [6] F. Kim, G. Nichol, C. Maynard, A. Hallstrom, *et al.*, “Effect of prehospital induction of mild hypothermia on survival and neurological status among adults with cardiac arrest: a randomized clinical trial,” *JAMA*, vol. 311, pp. 45–52, Jan. 2014.
- [7] M. Nadeau, M. Sage, M. Kohlhauer, R. Robert, *et al.*, “Liquid ventilator for ultrafast hypothermia induction in juvenile lambs: Preliminary results,” *Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, vol. 2015, pp. 1695–1698, Aug. 2015.
- [8] M. Chenoune, F. Lidouren, C. Adam, S. Pons, *et al.*, “Ultrafast and whole-body cooling with total liquid ventilation induces favorable neurological and cardiac outcomes after cardiac arrest in rabbits,” *Circulation*, vol. 124, pp. 901–911, 1–7, Aug. 2011.
- [9] L. Darbera, M. Chenoune, F. Lidouren, M. Kohlhauer, *et al.*, “Hypothermic liquid ventilation prevents early hemodynamic dysfunction and cardiovascular mortality

- after coronary artery occlusion complicated by cardiac arrest in rabbits,” *Critical Care Medicine*, vol. 41, pp. e457–465, Dec. 2013.
- [10] M. Kohlhauser, F. Lidouren, I. Remy-Jouet, N. Mongardon, *et al.*, “Hypothermic Total Liquid Ventilation Is Highly Protective Through Cerebral Hemodynamic Preservation and Sepsis-Like Mitigation After Asphyxial Cardiac Arrest*,” *Critical Care Medicine*, vol. 43, p. e420, Oct. 2015.
- [11] R. Tissier, S. Giraud, N. Quellard, B. Fernandez, *et al.*, “Kidney protection by hypothermic total liquid ventilation after cardiac arrest in rabbits,” *Anesthesiology*, vol. 120, pp. 861–869, Apr. 2014.
- [12] J. Bro-Jeppesen, J. Kjaergaard, M. Wanscher, N. Nielsen, *et al.*, “The inflammatory response after out-of-hospital cardiac arrest is not modified by targeted temperature management at 33 °C or 36 °C,” *Resuscitation*, vol. 85, pp. 1480–1487, Nov. 2014.
- [13] C. Atwood, M. S. Eisenberg, J. Herlitz, and T. D. Rea, “Incidence of EMS-treated out-of-hospital cardiac arrest in Europe,” *Resuscitation*, vol. 67, pp. 75–80, Oct. 2005.
- [14] K. B. Kern, “Optimal Treatment of Patients Surviving Out-of-Hospital Cardiac Arrest,” *JACC: Cardiovascular Interventions*, vol. 5, pp. 597–605, June 2012.
- [15] J. P. Nolan, R. W. Neumar, C. Adrie, M. Aibiki, *et al.*, “Post-cardiac arrest syndrome: Epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication: A Scientific Statement from the International Liaison Committee on Resuscitation; the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; the Council on Stroke,” *Resuscitation*, vol. 79, pp. 350–379, Dec. 2008.
- [16] Stub Dion, Bernard Stephen, Duffy Stephen J., and Kaye David M., “Post Cardiac Arrest Syndrome,” *Circulation*, vol. 123, pp. 1428–1435, Apr. 2011. Publisher: American Heart Association.
- [17] N. A. of Sciences-National Research Council, “Cardiopulmonary resuscitation,” *JAMA*, vol. 198, pp. 372–379, 1966.
- [18] H. E. Stephenson, L. C. Reid, and J. W. Hinton, “Some Common Denominators in 1200 Cases of Cardiac Arrest,” *Annals of Surgery*, vol. 137, pp. 731–742, May 1953.
- [19] Fugate Jennifer E., Brinjikji Waleed, Mandrekar Jay N., Cloft Harry J., *et al.*, “Post-Cardiac Arrest Mortality Is Declining,” *Circulation*, vol. 126, pp. 546–550, July 2012.
- [20] M. Peberdy, J. Ornato, G. Larkin, R. S. Braithwaite, *et al.*, “National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation I. Survival from in-hospital cardiac arrest during nights and weekends,” *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 299, pp. 785–92, Mar. 2008.

- [21] S. Laver, C. Farrow, D. Turner, and J. Nolan, "Mode of death after admission to an intensive care unit following cardiac arrest," *Intensive Care Medicine*, vol. 30, pp. 2126–2128, Nov. 2004.
- [22] V. M. Nadkarni, G. L. Larkin, M. A. Peberdy, S. M. Carey, *et al.*, "First Documented Rhythm and Clinical Outcome From In-Hospital Cardiac Arrest Among Children and Adults," *JAMA*, vol. 295, pp. 50–57, Jan. 2006. Publisher: American Medical Association.
- [23] T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, and R. J. Korthuis, "Cell Biology of Ischemia/Reperfusion Injury," *International review of cell and molecular biology*, vol. 298, pp. 229–317, 2012.
- [24] I. A. Silver and M. Erecińska, "Ion Homeostasis in Rat Brain in vivo: Intra- and Extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^{+}]$ in the Hippocampus during Recovery from Short-Term, Transient Ischemia," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 12, pp. 759–772, Sept. 1992.
- [25] R. W. Neumar, "Molecular mechanisms of ischemic neuronal injury," *Annals of Emergency Medicine*, vol. 36, pp. 483–506, Nov. 2000.
- [26] D. W. Choi, "Excitotoxic cell death," *Journal of Neurobiology*, vol. 23, pp. 1261–1276, Nov. 1992.
- [27] Y. Kinuta, M. Kimura, Y. Itokawa, M. Ishikawa, *et al.*, "Changes in xanthine oxidase in ischemic rat brain," *Journal of Neurosurgery*, vol. 71, pp. 417–420, Sept. 1989.
- [28] S. L. Linas, D. Whittenburg, and J. E. Repine, "Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury," *The American Journal of Physiology*, vol. 258, pp. F711–716, Mar. 1990.
- [29] P. Lipton, "Ischemic Cell Death in Brain Neurons," *Physiological Reviews*, vol. 79, pp. 1431–1568, Jan. 1999.
- [30] E. T. Chouchani, V. R. Pell, E. Gaude, D. Aksentijević, *et al.*, "Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS," *Nature*, vol. 515, pp. 431–435, Nov. 2014.
- [31] Z.-G. Sun, T.-T. Zhao, N. Lu, Y.-A. Yang, *et al.*, "Research Progress of Glycyrrhizic Acid on Antiviral Activity," *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 19, no. 10, pp. 826–832, 2019.
- [32] W. A. Pulsinelli, "Selective Neuronal Vulnerability: Morphological and Molecular Characteristics**Presented at the Sendai Forum '84 on Cerebrovascular Accidents.," in *Progress in Brain Research* (K. Kogure, K. A. Hossmann, B. K. Siesjö, and F. A. Welsh, eds.), vol. 63 of *Molecular Mechanisms of Ischemic Brain Damage*, pp. 29–37, Elsevier, Jan. 1985.

- [33] M. Horn and W. Schlote, "Delayed neuronal death and delayed neuronal recovery in the human brain following global ischemia," *Acta Neuropathologica*, vol. 85, no. 1, pp. 79–87, 1992.
- [34] R. W. Neumar, J. P. Nolan, C. Adrie, M. Aibiki, *et al.*, "Post-Cardiac Arrest Syndrome," *Circulation*, Dec. 2008.
- [35] K. A. Hossmann, U. Oeschlies, W. Schwindt, and H. Krep, "Electron microscopic investigation of rat brain after brief cardiac arrest," *Acta Neuropathologica*, vol. 101, pp. 101–113, Feb. 2001.
- [36] W. A. Pulsinelli, J. B. Brierley, and F. Plum, "Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia," *Annals of Neurology*, vol. 11, pp. 491–498, May 1982.
- [37] P. Tahsili-Fahadan, S. Farrokh, and R. G. Geocadin, "Hypothermia and brain inflammation after cardiac arrest," *Brain Circulation*, vol. 4, no. 1, pp. 1–13, 2018.
- [38] J.-M. Lee, M. C. Grabb, G. J. Zipfel, and D. W. Choi, "Brain tissue responses to ischemia," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, pp. 723–731, Sept. 2000.
- [39] J. N. Cobley, M. L. Fiorello, and D. M. Bailey, "13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress," *Redox Biology*, vol. 15, pp. 490–503, May 2018.
- [40] R. M. Adibhatla and J. F. Hatcher, "Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities," *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 12, pp. 125–169, Jan. 2010.
- [41] J. W. Olney, "Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate," *Science (New York, N.Y.)*, vol. 164, pp. 719–721, May 1969.
- [42] Sundgreen Claus, Larsen Fin Stolze, Herzog Tina Maria, Knudsen Gitte Moos, *et al.*, "Autoregulation of Cerebral Blood Flow in Patients Resuscitated From Cardiac Arrest," *Stroke*, vol. 32, pp. 128–132, Jan. 2001.
- [43] R. C. Crumrine and J. C. LaManna, "Regional Cerebral Metabolites, Blood Flow, Plasma Volume, and Mean Transit Time in Total Cerebral Ischemia in the Rat," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 11, pp. 272–282, Mar. 1991.
- [44] S. Takagi, L. Cocito, and K. A. Hossmann, "Blood recirculation and pharmacological responsiveness of the cerebral vasculature following prolonged ischemia of cat brain," *Stroke*, vol. 8, pp. 707–712, Dec. 1977.
- [45] Cerchiari E L, Hoel T M, Safar P, and Sciabassi R J, "Protective effects of combined superoxide dismutase and deferoxamine on recovery of cerebral blood flow and function after cardiac arrest in dogs," *Stroke*, vol. 18, pp. 869–878, Sept. 1987.
- [46] J. M. D. van den Brule, E. J. Vinke, L. M. van Loon, J. G. van der Hoeven, *et al.*, "Low spontaneous variability in cerebral blood flow velocity in non-survivors after cardiac arrest," *Resuscitation*, vol. 111, pp. 110–115, 2017.

- [47] M. Fischer and K. A. Hossmann, “No-reflow after cardiac arrest,” *Intensive Care Medicine*, vol. 21, pp. 132–141, Feb. 1995.
- [48] B. Iordanova, L. Li, R. S. B. Clark, and M. D. Manole, “Alterations in Cerebral Blood Flow after Resuscitation from Cardiac Arrest,” *Frontiers in Pediatrics*, vol. 5, Aug. 2017.
- [49] P. Safar, W. Stezoski, and E. M. Nemoto, “Amelioration of brain damage after 12 minutes’ cardiac arrest in dogs,” *Archives of Neurology*, vol. 33, pp. 91–95, Feb. 1976.
- [50] Y. Leonov, F. Sterz, P. Safar, D. W. Johnson, *et al.*, “Hypertension with hemodilution prevents multifocal cerebral hypoperfusion after cardiac arrest in dogs,” *Stroke*, vol. 23, pp. 45–53, Jan. 1992.
- [51] M. Forsman, H. P. Aarseth, H. K. Nordby, A. Skulberg, *et al.*, “Effects of nimodipine on cerebral blood flow and cerebrospinal fluid pressure after cardiac arrest: correlation with neurologic outcome,” *Anesthesia and Analgesia*, vol. 68, pp. 436–443, Apr. 1989.
- [52] R. R. Noppens, R. F. Kelm, R. Lindemann, K. Engelhard, *et al.*, “Effects of a single-dose hypertonic saline hydroxyethyl starch on cerebral blood flow, long-term outcome, neurogenesis, and neuronal survival after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats*,” *Critical Care Medicine*, vol. 40, pp. 2149–2156, July 2012.
- [53] J. S. Park, Y. You, J. H. Min, I. Yoo, *et al.*, “Study on the timing of severe blood-brain barrier disruption using cerebrospinal fluid-serum albumin quotient in post cardiac arrest patients treated with targeted temperature management,” *Resuscitation*, vol. 135, pp. 118–123, 2019.
- [54] A. Miculescu, H. S. Sharma, C. Martijn, and L. Wiklund, “Methylene blue protects the cortical blood–brain barrier against ischemia/reperfusion-induced disruptions*,” *Critical Care Medicine*, vol. 38, pp. 2199–2206, Nov. 2010.
- [55] J. Li, C. Li, W. Yuan, J. Wu, *et al.*, “Mild hypothermia alleviates brain oedema and blood-brain barrier disruption by attenuating tight junction and adherens junction breakdown in a swine model of cardiopulmonary resuscitation,” *PLOS ONE*, vol. 12, p. e0174596, Mar. 2017.
- [56] H. Jiao, Z. Wang, Y. Liu, P. Wang, *et al.*, “Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult,” *Journal of molecular neuroscience: MN*, vol. 44, pp. 130–139, June 2011.
- [57] R. Pluta, A. S. Lossinsky, H. M. Wiśniewski, and M. J. Mossakowski, “Early blood-brain barrier changes in the rat following transient complete cerebral ischemia induced by cardiac arrest,” *Brain Research*, vol. 633, pp. 41–52, Jan. 1994.
- [58] J. Hästbacka, M. Tiainen, M. Hynninen, E. Kolho, *et al.*, “Serum matrix metalloproteinases in patients resuscitated from cardiac arrest. The association with therapeutic hypothermia,” *Resuscitation*, vol. 83, pp. 197–201, Feb. 2012.

- [59] A. Prat, K. Biernacki, K. Wosik, and J. P. Antel, "Glial cell influence on the human blood-brain barrier," *Glia*, vol. 36, pp. 145–155, Nov. 2001.
- [60] W. Zhang, C. Smith, C. Howlett, and D. Stanimirovic, "Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1beta," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 20, pp. 967–978, June 2000.
- [61] J. M. Weiss, S. A. Downie, W. D. Lyman, and J. W. Berman, "Astrocyte-derived monocyte-chemoattractant protein-1 directs the transmigration of leukocytes across a model of the human blood-brain barrier," *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 161, pp. 6896–6903, Dec. 1998.
- [62] C. T. Capaldo and A. Nusrat, "Cytokine regulation of tight junctions," *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1788, pp. 864–871, Apr. 2009.
- [63] C. Kaur and E. A. Ling, "Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions," *Current Neurovascular Research*, vol. 5, pp. 71–81, Feb. 2008.
- [64] B. Obermeier, R. Daneman, and R. M. Ransohoff, "Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier," *Nature Medicine*, vol. 19, pp. 1584–1596, Dec. 2013. Number: 12 Publisher: Nature Publishing Group.
- [65] M. Fujioka, K. Okuchi, T. Sakaki, K. Hiramatsu, *et al.*, "Specific changes in human brain following reperfusion after cardiac arrest," *Stroke*, vol. 25, pp. 2091–2095, Oct. 1994.
- [66] R. Naples, E. Ellison, and W. J. Brady, "Cranial computed tomography in the resuscitated patient with cardiac arrest," *The American Journal of Emergency Medicine*, vol. 27, pp. 63–67, Jan. 2009.
- [67] S. Langkjær, C. Hassager, J. Kjaergaard, I. Salam, *et al.*, "Prognostic value of reduced discrimination and oedema on cerebral computed tomography in a daily clinical cohort of out-of-hospital cardiac arrest patients," *Resuscitation*, vol. 92, pp. 141–147, July 2015.
- [68] J. Inamasu, S. Miyatake, M. Nakatsukasa, H. Koh, *et al.*, "Loss of gray-white matter discrimination as an early CT sign of brain ischemia/hypoxia in victims of asphyxial cardiac arrest," *Emergency Radiology*, vol. 18, pp. 295–298, Aug. 2011.
- [69] Y. Morimoto, O. Kemmotsu, K. Kitami, I. Matsubara, *et al.*, "Acute brain swelling after out-of-hospital cardiac arrest: Pathogenesis and outcome," *Critical Care Medicine*, vol. 21, pp. 104–110, Jan. 1993.
- [70] T. Sakabe, A. Tateishi, Y. Miyauchi, T. Maekawa, *et al.*, "Intracranial pressure following cardiopulmonary resuscitation," *Intensive Care Medicine*, vol. 13, pp. 256–259, June 1987.

- [71] C. Adrie, M. Adib-Conquy, I. Laurent, M. Monchi, *et al.*, "Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome," *Circulation*, vol. 106, pp. 562–568, July 2002.
- [72] S. Gando, S. Nanzaki, Y. Morimoto, S. Kobayashi, *et al.*, "Alterations of soluble L- and P-selectins during cardiac arrest and CPR," *Intensive Care Medicine*, vol. 25, pp. 588–593, June 1999.
- [73] A. Geppert, G. Zorn, G. D. Karth, M. Haumer, *et al.*, "Soluble selectins and the systemic inflammatory response syndrome after successful cardiopulmonary resuscitation," *Critical Care Medicine*, vol. 28, pp. 2360–2365, July 2000.
- [74] J. Bro-Jeppesen, J. Kjaergaard, M. Wanscher, N. Nielsen, *et al.*, "Systemic Inflammatory Response and Potential Prognostic Implications After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Substudy of the Target Temperature Management Trial*," *Critical Care Medicine*, vol. 43, pp. 1223–1232, June 2015.
- [75] K. Başer, H. D. Baş, P. Attaluri, T. Rodrigues, *et al.*, "Changes in neutrophil-to-lymphocyte ratios in postcardiac arrest patients treated with targeted temperature management," *Anatolian Journal of Cardiology*, vol. 18, p. 0, Sept. 2017.
- [76] C. Weiser, M. Schwameis, F. Sterz, H. Herkner, *et al.*, "Mortality in patients resuscitated from out-of-hospital cardiac arrest based on automated blood cell count and neutrophil lymphocyte ratio at admission," *Resuscitation*, vol. 116, pp. 49–55, July 2017.
- [77] V. H. Patel, P. Vendittelli, R. Garg, S. Szpunar, *et al.*, "Neutrophil-lymphocyte ratio: A prognostic tool in patients with in-hospital cardiac arrest," *World Journal of Critical Care Medicine*, vol. 8, pp. 9–17, Feb. 2019.
- [78] P. Villosi, D. Grimaldi, S. Spadaro, C. R. Shinotsuka, *et al.*, "Lymphopaenia in cardiac arrest patients," *Annals of Intensive Care*, vol. 7, p. 85, Aug. 2017.
- [79] R. J. Benschop, M. Rodriguez-Feuerhahn, and M. Schedlowski, "Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions," *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 10, pp. 77–91, June 1996.
- [80] C. Dp, W. N, and I. M, "Apoptosis of Peripheral Blood Lymphocytes Is Induced by Catecholamines," May 2000. ISSN: 0021-4868 Issue: 3 Library Catalog: pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Publisher: Jpn Heart J Volume: 41.
- [81] G. C. Jickling, D. Liu, B. P. Ander, B. Stamova, *et al.*, "Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 35, pp. 888–901, June 2015.
- [82] M. A. Peberdy, L. W. Andersen, A. Abbate, L. R. Thacker, *et al.*, "Inflammatory markers following resuscitation from out-of-hospital cardiac arrest-A prospective multicenter observational study," *Resuscitation*, vol. 103, pp. 117–124, 2016.

- [83] N. Mongardon, S. Perbet, V. Lemiale, F. Dumas, *et al.*, “Infectious complications in out-of-hospital cardiac arrest patients in the therapeutic hypothermia era*,” *Critical Care Medicine*, vol. 39, pp. 1359–1364, June 2011.
- [84] O. Gajic, E. Festic, and B. Afessa, “Infectious complications in survivors of cardiac arrest admitted to the medical intensive care unit,” *Resuscitation*, vol. 60, pp. 65–69, Jan. 2004.
- [85] H. Kamel and C. Iadecola, “Brain-Immune Interactions and Ischemic Stroke,” *Archives of neurology*, vol. 69, pp. 576–581, May 2012.
- [86] C. Adrie, I. Laurent, M. Monchi, A. Cariou, *et al.*, “Postresuscitation disease after cardiac arrest: a sepsis-like syndrome?,” *Current Opinion in Critical Care*, vol. 10, pp. 208–212, June 2004.
- [87] A. Liesz, A. Dalpke, E. Mracsko, D. J. Antoine, *et al.*, “DAMP Signaling is a Key Pathway Inducing Immune Modulation after Brain Injury,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 35, pp. 583–598, Jan. 2015.
- [88] Y. XIANG, H. ZHAO, J. WANG, L. ZHANG, *et al.*, “Inflammatory mechanisms involved in brain injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation,” *Biomedical Reports*, vol. 5, pp. 11–17, July 2016.
- [89] N. Mai, K. Miller-Rhodes, S. Knowlden, and M. W. Halterman, “The post-cardiac arrest syndrome: A case for lung-brain coupling and opportunities for neuroprotection,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 39, pp. 939–958, June 2019.
- [90] K. C. Ma, E. J. Schenck, M. A. Pabon, and A. M. K. Choi, “The Role of Danger Signals in the Pathogenesis and Perpetuation of Critical Illness,” *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, Oct. 2017.
- [91] G. Y. Chen and G. Nuñez, “Sterile inflammation: sensing and reacting to damage,” *Nature Reviews. Immunology*, vol. 10, pp. 826–837, Dec. 2010.
- [92] N. Akhter, A. Madhoun, H. Arefanian, A. Wilson, *et al.*, “Oxidative Stress Induces Expression of the Toll-Like Receptors (TLRs) 2 and 4 in the Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Implications for Metabolic Inflammation,” *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, vol. 53, no. 1, pp. 1–18, 2019.
- [93] K. Rusai, D. Sollinger, M. Baumann, B. Wagner, *et al.*, “Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury,” *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, vol. 25, pp. 853–860, May 2010.
- [94] Y. Yang, J. Lv, S. Jiang, Z. Ma, *et al.*, “The emerging role of Toll-like receptor 4 in myocardial inflammation,” *Cell Death & Disease*, vol. 7, p. e2234, May 2016.

- [95] F. Hua, H. Tang, J. Wang, M. C. Prunty, *et al.*, “TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 35, pp. 536–542, Apr. 2015.
- [96] K. A. Cavassani, M. Ishii, H. Wen, M. A. Schaller, *et al.*, “TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 205, pp. 2609–2621, Oct. 2008.
- [97] J. J. Oppenheim and D. Yang, “Alarmins: chemotactic activators of immune responses,” *Current Opinion in Immunology*, vol. 17, pp. 359–365, Aug. 2005.
- [98] H. Kono and K. L. Rock, “How dying cells alert the immune system to danger,” *Nature Reviews. Immunology*, vol. 8, pp. 279–289, Apr. 2008.
- [99] L. Kulik, S. D. Fleming, C. Moratz, J. W. Reuter, *et al.*, “Pathogenic natural antibodies recognizing annexin IV are required to develop intestinal ischemia-reperfusion injury,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 182, pp. 5363–5373, May 2009.
- [100] H. K. Eltzschig and T. Eckle, “Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation,” *Nature medicine*, vol. 17, Nov. 2011.
- [101] U. Andersson, H. Wang, K. Palmblad, A. C. Aveberger, *et al.*, “High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 192, pp. 565–570, Aug. 2000.
- [102] J. Qiu, M. Nishimura, Y. Wang, J. R. Sims, *et al.*, “Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 28, pp. 927–938, May 2008.
- [103] D. Musumeci, G. N. Roviello, and D. Montesarchio, “An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies,” *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 141, pp. 347–357, Mar. 2014.
- [104] J. Li, R. Kokkola, S. Tabibzadeh, R. Yang, *et al.*, “Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1,” *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, vol. 9, pp. 37–45, Feb. 2003.
- [105] H. Wang, O. Bloom, M. Zhang, J. M. Vishnubhakat, *et al.*, “HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 285, pp. 248–251, July 1999.
- [106] P. Scaffidi, T. Misteli, and M. E. Bianchi, “Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation,” *Nature*, vol. 418, pp. 191–195, July 2002.
- [107] B. Rendon-Mitchell, M. Ochani, J. Li, J. Han, *et al.*, “IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 170, pp. 3890–3897, Apr. 2003.

- [108] H. Wang, H. Yang, and K. J. Tracey, “Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 255, pp. 320–331, Mar. 2004.
- [109] D. Agnello, H. Wang, H. Yang, K. J. Tracey, *et al.*, “HMGB-1, a DNA-binding protein with cytokine activity, induces brain TNF and IL-6 production, and mediates anorexia and taste aversion,” *Cytokine*, vol. 18, pp. 231–236, May 2002.
- [110] J. Qiu, J. Xu, Y. Zheng, Y. Wei, *et al.*, “High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia,” *Stroke*, vol. 41, pp. 2077–2082, Sept. 2010.
- [111] R. Palumbo, F. D. Marchis, T. Pusterla, A. Conti, *et al.*, “Src family kinases are necessary for cell migration induced by extracellular HMGB1,” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 86, no. 3, pp. 617–623, 2009. [_eprint: https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0908581](https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1189/jlb.0908581).
- [112] M. Schiraldi, A. Raucci, L. M. Muñoz, E. Livoti, *et al.*, “HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4,” *Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, pp. 551–563, Mar. 2012. Publisher: The Rockefeller University Press.
- [113] A. Rouhiainen, S. Tumova, L. Valmu, N. Kalkkinen, *et al.*, “Pivotal advance: analysis of proinflammatory activity of highly purified eukaryotic recombinant HMGB1 (amphoterin),” *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 81, pp. 49–58, Jan. 2007.
- [114] D. Tang, T. R. Billiar, and M. T. Lotze, “A Janus Tale of Two Active High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Redox States,” *Molecular Medicine*, vol. 18, pp. 1360–1362, Oct. 2012.
- [115] M. Xu, G.-m. Zhou, L.-h. Wang, L. Zhu, *et al.*, “Inhibiting High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Attenuates Inflammatory Cytokine Expression and Neurological Deficit in Ischemic Brain Injury Following Cardiac Arrest in Rats,” *Inflammation*, vol. 39, pp. 1594–1602, Aug. 2016.
- [116] U. S. Bhalala, R. C. Koehler, and S. Kannan, “Neuroinflammation and Neuroimmune Dysregulation after Acute Hypoxic-Ischemic Injury of Developing Brain,” *Frontiers in Pediatrics*, vol. 2, 2015.
- [117] C. Iadecola and J. Anrather, “The immunology of stroke: from mechanisms to translation,” *Nature Medicine*, vol. 17, pp. 796–808, July 2011.
- [118] F. Aloisi, “Immune function of microglia,” *Glia*, vol. 36, pp. 165–179, Nov. 2001.
- [119] S. Fumagalli, C. Perego, F. Pischiutta, E. R. Zanier, *et al.*, “The ischemic environment drives microglia and macrophage function,” *Frontiers in Neurology*, vol. 6, p. 81, 2015.
- [120] M. A. Yenari, T. M. Kauppinen, and R. A. Swanson, “Microglial activation in stroke: Therapeutic targets,” *Neurotherapeutics*, vol. 7, pp. 378–391, Oct. 2010.

- [121] M. Shoykhet, D. J. Simons, H. Alexander, C. Hosler, *et al.*, “Thalamocortical Dysfunction and Thalamic Injury after Asphyxial Cardiac Arrest in Developing Rats,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 32, pp. 4972–4981, Apr. 2012.
- [122] A. Denes, R. Vidyasagar, J. Feng, J. Narvainen, *et al.*, “Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, pp. 1941–1953, Dec. 2007.
- [123] C. Zhang, N. R. Brandon, K. Koper, P. Tang, *et al.*, “Invasion of Peripheral Immune Cells into Brain Parenchyma after Cardiac Arrest and Resuscitation,” *Aging and Disease*, vol. 9, pp. 412–425, June 2018.
- [124] M. Nedergaard, B. Ransom, and S. A. Goldman, “New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain,” *Trends in Neurosciences*, vol. 26, pp. 523–530, Oct. 2003.
- [125] R. A. Swanson, W. Ying, and T. M. Kauppinen, “Astrocyte influences on ischemic neuronal death,” *Current Molecular Medicine*, vol. 4, pp. 193–205, Mar. 2004.
- [126] P. A. Carpentier, W. S. Begolka, J. K. Olson, A. Elhofy, *et al.*, “Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli,” *Glia*, vol. 49, pp. 360–374, Feb. 2005.
- [127] S. Matsumoto, M. Matsumoto, A. Yamashita, K. Ohtake, *et al.*, “The temporal profile of the reaction of microglia, astrocytes, and macrophages in the delayed onset paraplegia after transient spinal cord ischemia in rabbits,” *Anesthesia and Analgesia*, vol. 96, pp. 1777–1784, table of contents, June 2003.
- [128] J. L. Zamanian, L. Xu, L. C. Foo, N. Nouri, *et al.*, “Genomic analysis of reactive astrogliosis,” *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, vol. 32, pp. 6391–6410, May 2012.
- [129] G. Deng, J. Carter, R. J. Traystman, D. H. Wagner, *et al.*, “Pro-inflammatory T-lymphocytes rapidly infiltrate into the brain and contribute to neuronal injury following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation,” *Journal of Neuroimmunology*, vol. 274, pp. 132–140, Sept. 2014.
- [130] M. Gelderblom, F. Leypoldt, K. Steinbach, D. Behrens, *et al.*, “Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke,” *Stroke*, vol. 40, pp. 1849–1857, May 2009.
- [131] J. H. Garcia, K. F. Liu, Y. Yoshida, J. Lian, *et al.*, “Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat).,” *The American Journal of Pathology*, vol. 144, pp. 188–199, Jan. 1994.
- [132] H. X. Chu, H. A. Kim, S. Lee, J. P. Moore, *et al.*, “Immune cell infiltration in malignant middle cerebral artery infarction: comparison with transient cerebral

- ischemia,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 34, pp. 450–459, Mar. 2014.
- [133] G. Enzmann, C. Mysiorek, R. Gorina, Y.-J. Cheng, *et al.*, “The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury,” *Acta Neuropathologica*, vol. 125, pp. 395–412, Mar. 2013.
- [134] S. Love and R. Barber, “Expression of P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in human brain after focal infarction or cardiac arrest,” *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 27, pp. 465–473, Dec. 2001.
- [135] P. D. Hurn, S. Subramanian, S. M. Parker, M. E. Afentoulis, *et al.*, “T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation,” *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 27, pp. 1798–1805, Nov. 2007.
- [136] A. Liesz, E. Suri-Payer, C. Veltkamp, H. Doerr, *et al.*, “Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke,” *Nature Medicine*, vol. 15, pp. 192–199, Feb. 2009.
- [137] M. A. Santana and Y. Rosenstein, “What it takes to become an effector T cell: the process, the cells involved, and the mechanisms,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 195, pp. 392–401, June 2003.
- [138] S. R. Satpute, J. M. Park, H. R. Jang, P. Agreda, *et al.*, “The role for T cell repertoire/antigen-specific interactions in experimental kidney ischemia reperfusion injury,” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, vol. 183, pp. 984–992, July 2009.
- [139] Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, *et al.*, “Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion,” *Stroke*, vol. 25, pp. 1469–1475, July 1994.
- [140] S. Gando and I. Tedo, “Increased neutrophil elastase release in patients with cardiopulmonary arrest: role of elastase inhibitor,” *Intensive Care Medicine*, vol. 21, pp. 636–640, Aug. 1995.
- [141] G. J. del Zoppo, G. W. Schmid-Schönbein, E. Mori, B. R. Copeland, *et al.*, “Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons,” *Stroke*, vol. 22, pp. 1276–1283, Oct. 1991.
- [142] M.-L. von Brühl, K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, *et al.*, “Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo,” *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 209, pp. 819–835, Apr. 2012.
- [143] D. F. Emerich, R. L. Dean, and R. T. Bartus, “The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct?,” *Experimental Neurology*, vol. 173, pp. 168–181, Jan. 2002.

- [144] Planas Anna M., “Role of Immune Cells Migrating to the Ischemic Brain,” *Stroke*, vol. 49, pp. 2261–2267, Sept. 2018.
- [145] A. Suzumura, “Neuron-microglia interaction in neuroinflammation,” *Current Protein & Peptide Science*, vol. 14, pp. 16–20, Feb. 2013.
- [146] M. J. Morgan, Y.-S. Kim, and Z.-g. Liu, “TNF α and reactive oxygen species in necrotic cell death,” *Cell Research*, vol. 18, pp. 343–349, Mar. 2008.
- [147] Zhang Cuihua, Xu Xiangbin, Potter Barry J., Wang Wei, *et al.*, “TNF- α Contributes to Endothelial Dysfunction in Ischemia/Reperfusion Injury,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 26, pp. 475–480, Mar. 2006.
- [148] A. Janata, I. A. M. Magnet, T. Uray, J. P. Stezoski, *et al.*, “Regional TNF α mapping in the brain reveals the striatum as a neuroinflammatory target after ventricular fibrillation cardiac arrest in rats,” *Resuscitation*, vol. 85, pp. 694–701, May 2014.
- [149] T. Drabek, A. Janata, C. D. Wilson, J. Stezoski, *et al.*, “Minocycline attenuates brain tissue levels of TNF- α produced by neurons after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats,” *Resuscitation*, vol. 85, pp. 284–291, Feb. 2014.
- [150] P. Teschendorf, M. Albertsmeier, P. Vogel, S. A. Padosch, *et al.*, “Neurological outcome and inflammation after cardiac arrest—effects of protein C in rats,” *Resuscitation*, vol. 79, pp. 316–324, Nov. 2008.
- [151] H. R. Modi, Q. Wang, S. GD, D. Sherman, *et al.*, “Intranasal post-cardiac arrest treatment with orexin-A facilitates arousal from coma and ameliorates neuroinflammation,” *PLoS ONE*, vol. 12, Sept. 2017.
- [152] B. W. McColl, N. J. Rothwell, and S. M. Allan, “Systemic Inflammatory Stimulus Potentiates the Acute Phase and CXC Chemokine Responses to Experimental Stroke and Exacerbates Brain Damage via Interleukin-1- and Neutrophil-Dependent Mechanisms,” *Journal of Neuroscience*, vol. 27, pp. 4403–4412, Apr. 2007.
- [153] E. N. Benveniste, “Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action,” *The American Journal of Physiology*, vol. 263, pp. C1–16, July 1992.
- [154] M. Bernardes-Silva, D. C. Anthony, A. C. Issekutz, and V. H. Perry, “Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: the role of E- and P-selectins,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 21, pp. 1115–1124, Sept. 2001.
- [155] A. Y. Fouda, A. Kozak, A. Alhusban, J. A. Switzer, *et al.*, “Anti-inflammatory IL-10 is upregulated in both hemispheres after experimental ischemic stroke: Hypertension blunts the response,” *Experimental & Translational Stroke Medicine*, vol. 5, p. 12, Nov. 2013.

- [156] pubmeddev and Z. Y. al, et, "Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. - PubMed - NCBI."
- [157] M. Grilli, I. Barbieri, H. Basudev, R. Brusa, *et al.*, "Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage," *The European Journal of Neuroscience*, vol. 12, pp. 2265–2272, July 2000.
- [158] F. C. Barone and G. Z. Feuerstein, "Inflammatory Mediators and Stroke: New Opportunities for Novel Therapeutics;," *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Aug. 2016.
- [159] J. Losy and J. Zaremba, "Monocyte chemoattractant protein-1 is increased in the cerebrospinal fluid of patients with ischemic stroke," *Stroke*, vol. 32, pp. 2695–2696, Nov. 2001.
- [160] O. B. Dimitrijevic, S. M. Stamatovic, R. F. Keep, and A. V. Andjelkovic, "Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice," *Stroke*, vol. 38, pp. 1345–1353, Apr. 2007.
- [161] S. Takami, M. Minami, I. Nagata, S. Namura, *et al.*, "Chemokine receptor antagonist peptide, viral MIP-II, protects the brain against focal cerebral ischemia in mice," *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 21, pp. 1430–1435, Dec. 2001.
- [162] E. Dejonckheere, R. E. Vandenbroucke, and C. Libert, "Matrix metalloproteinases as drug targets in ischemia/reperfusion injury," *Drug Discovery Today*, vol. 16, pp. 762–778, Sept. 2011.
- [163] D. Amantea, G. Nappi, G. Bernardi, G. Bagetta, *et al.*, "Post[U+2010]ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators," *The FEBS Journal*, vol. 276, pp. 13–26, Jan. 2009.
- [164] D. W. Benson, G. R. Williams, F. C. Spencer, and A. J. Yates, "THE USE OF HYPOTHERMIA AFTER CARDIAC ARREST," *Anesthesia & Analgesia*, vol. 38, pp. 423–428, Dec. 1959.
- [165] G. R. Williams and F. C. Spencer, "The Clinical Use of Hypothermia Following Cardiac Arrest," *Annals of Surgery*, vol. 148, pp. 462–468, Sept. 1958.
- [166] D. W. Marion, Y. Leonov, M. Ginsberg, L. M. Katz, *et al.*, "Resuscitative hypothermia," *Critical Care Medicine*, vol. 24, Feb. 1996.
- [167] F. Sterz, P. Safar, S. Tisherman, A. Radovsky, *et al.*, "Mild hypothermic cardiopulmonary resuscitation improves outcome after prolonged cardiac arrest in dogs," *Critical Care Medicine*, vol. 19, pp. 379–389, Mar. 1991.
- [168] H. Olai, G. Thornéus, H. Watson, M. Macleod, *et al.*, "Meta-analysis of targeted temperature management in animal models of cardiac arrest," *Intensive Care Medicine Experimental*, vol. 8, p. 3, Jan. 2020.

- [169] W. D. Dietrich, R. Busto, O. Alonso, M. Y. Globus, *et al.*, “Intraischemic but not postischemic brain hypothermia protects chronically following global forebrain ischemia in rats,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 13, pp. 541–549, July 1993.
- [170] F. A. Welsh and V. A. Harris, “Postischemic hypothermia fails to reduce ischemic injury in gerbil hippocampus,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 11, pp. 617–620, July 1991.
- [171] D. Che, L. Li, C. M. Kopil, Z. Liu, *et al.*, “Impact of therapeutic hypothermia onset and duration on survival, neurologic function, and neurodegeneration after cardiac arrest,” *Critical Care Medicine*, vol. 39, pp. 1423–1430, June 2011.
- [172] K. Polderman, “Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia,” *Critical Care Medicine*, vol. 37, July 2009.
- [173] S. Hachimi-Idrissi, A. Van Hemelrijck, A. Michotte, I. Smolders, *et al.*, “Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats,” *Brain Research*, vol. 1019, pp. 217–225, Sept. 2004.
- [174] Lei B, Tan X, Cai H, Xu Q, *et al.*, “Effect of moderate hypothermia on lipid peroxidation in canine brain tissue after cardiac arrest and resuscitation,” *Stroke*, vol. 25, pp. 147–152, Jan. 1994. Publisher: American Heart Association.
- [175] C. M. Maier, G. H. Sun, D. Cheng, M. A. Yenari, *et al.*, “Effects of Mild Hypothermia on Superoxide Anion Production, Superoxide Dismutase Expression, and Activity Following Transient Focal Cerebral Ischemia,” *Neurobiology of Disease*, vol. 11, pp. 28–42, Oct. 2002.
- [176] T. Horiguchi, K. Shimizu, M. Ogino, S. Suga, *et al.*, “Postischemic hypothermia inhibits the generation of hydroxyl radical following transient forebrain ischemia in rats,” *Journal of Neurotrauma*, vol. 20, pp. 511–520, May 2003.
- [177] Z. Zhang, R. A. Sobel, D. Cheng, G. K. Steinberg, *et al.*, “Mild hypothermia increases Bcl-2 protein expression following global cerebral ischemia,” *Molecular Brain Research*, vol. 95, pp. 75–85, Nov. 2001.
- [178] E. Eberspächer, C. Werner, K. Engelhard, M. Pape, *et al.*, “Long-term effects of hypothermia on neuronal cell death and the concentration of apoptotic proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats,” *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, vol. 49, no. 4, pp. 477–487, 2005.
- [179] H. Zhao, M. A. Yenari, D. Cheng, R. M. Sapolsky, *et al.*, “Biphasic Cytochrome c Release After Transient Global Ischemia and its Inhibition by Hypothermia;,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Mar. 2005.

- [180] J. E. Lee, Y. J. Yoon, M. E. Moseley, and M. A. Yenari, "Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase—2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke," *Journal of Neurosurgery*, vol. 103, pp. 289–297, Aug. 2005. Publisher: Journal of Neurosurgery Publishing Group.
- [181] B. Duz, E. Oztas, T. Erginay, E. Erdogan, *et al.*, "The effect of moderate hypothermia in acute ischemic stroke on pericyte migration: An ultrastructural study," *Cryobiology*, vol. 55, pp. 279–284, Dec. 2007.
- [182] Hamann Gerhard F., Burggraf Dorothe, Martens Helge K., Liebetrau Martin, *et al.*, "Mild to Moderate Hypothermia Prevents Microvascular Basal Lamina Antigen Loss in Experimental Focal Cerebral Ischemia," *Stroke*, vol. 35, pp. 764–769, Mar. 2004. Publisher: American Heart Association.
- [183] A. Kimura, S. Sakurada, H. Ohkuni, Y. Todome, *et al.*, "Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells," *Critical Care Medicine*, vol. 30, pp. 1499–1502, July 2002.
- [184] Y. Yanagawa, M. Kawakami, and Y. Okada, "Moderate hypothermia alters interleukin-6 and interleukin-1 α reactions in ischemic brain in mice," *Resuscitation*, vol. 53, pp. 93–99, Apr. 2002.
- [185] V. Akriotis and W. D. Biggar, "The Effects of Hypothermia on Neutrophil Function In Vitro," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 37, no. 1, pp. 51–61, 1985. [_eprint: https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jlb.37.1.51](https://jlb.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jlb.37.1.51).
- [186] G. J. Wang, H. Y. Deng, C. M. Maier, G. H. Sun, *et al.*, "Mild hypothermia reduces ICAM-1 expression, neutrophil infiltration and microglia/monocyte accumulation following experimental stroke," *Neuroscience*, vol. 114, pp. 1081–1090, Nov. 2002.
- [187] K. Kumar and A. T. Evans, "Effect of hypothermia on microglial reaction in ischemic brain," *Neuroreport*, vol. 8, pp. 947–950, Mar. 1997.
- [188] C. W. Callaway, J. C. Rittenberger, E. S. Logue, and M. J. McMichael, "Hypothermia after cardiac arrest does not alter serum inflammatory markers," *Critical Care Medicine*, vol. 36, pp. 2607–2612, Sept. 2008.
- [189] M. Zhou, P. Wang, Z. Yang, H. Wu, *et al.*, "Spontaneous hypothermia ameliorated inflammation and neurologic deficit in rat cardiac arrest models following resuscitation," *Molecular Medicine Reports*, vol. 17, pp. 2127–2136, Feb. 2018.
- [190] M. Fries, C. Stoppe, D. Brücken, R. Rossaint, *et al.*, "Influence of mild therapeutic hypothermia on the inflammatory response after successful resuscitation from cardiac arrest," *Journal of Critical Care*, vol. 24, pp. 453–457, Sept. 2009.
- [191] Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group, "Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest," *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, pp. 549–556, Feb. 2002.

- [192] S. A. Bernard, T. W. Gray, M. D. Buist, B. M. Jones, *et al.*, “Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 346, pp. 557–563, Feb. 2002.
- [193] M. Holzer, S. A. Bernard, S. Hachimi-Idrissi, R. O. Roine, *et al.*, “Hypothermia for neuroprotection after cardiac arrest: systematic review and individual patient data meta-analysis,” *Critical Care Medicine*, vol. 33, pp. 414–418, Feb. 2005.
- [194] L. J. Morrison, C. D. Deakin, P. T. Morley, C. W. Callaway, *et al.*, “Part 8: Advanced life support: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations,” *Circulation*, vol. 122, pp. S345–421, Oct. 2010.
- [195] M. A. Peberdy, C. W. Callaway, R. W. Neumar, R. G. Geocadin, *et al.*, “Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care,” *Circulation*, vol. 122, pp. S768–786, Nov. 2010.
- [196] A. A. Rabinstein, “How Cool It Is: Targeted Temperature Management for Brain Protection Post-Cardiac Arrest,” *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 37, pp. 34–41, Feb. 2016.
- [197] N. Nielsen, H. Friberg, C. Gluud, J. Herlitz, *et al.*, “Hypothermia after cardiac arrest should be further evaluated—a systematic review of randomised trials with meta-analysis and trial sequential analysis,” *International Journal of Cardiology*, vol. 151, pp. 333–341, Sept. 2011.
- [198] R. B. Schock, A. Janata, W. F. Peacock, N. S. Deal, *et al.*, “Time to Cooling Is Associated with Resuscitation Outcomes,” *Therapeutic Hypothermia and Temperature Management*, vol. 6, pp. 208–217, Dec. 2016.
- [199] D. Stanger, T. Kawano, N. Malhi, B. Grunau, *et al.*, “Door [U+2010] to [U+2010] Targeted Temperature Management Initiation Time and Outcomes in Out [U+2010] of [U+2010] Hospital Cardiac Arrest: Insights From the Continuous Chest Compressions Trial,” *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, vol. 8, May 2019.
- [200] P. Nordberg, F. S. Taccone, A. Truhlar, S. Forsberg, *et al.*, “Effect of Trans-Nasal Evaporative Intra-arrest Cooling on Functional Neurologic Outcome in Out-of-Hospital Cardiac Arrest: The PRINCESS Randomized Clinical Trial,” *JAMA*, vol. 321, no. 17, pp. 1677–1685, 2019.
- [201] J.-B. Lascarrou, H. Merdji, A. Le Gouge, G. Colin, *et al.*, “Targeted Temperature Management for Cardiac Arrest with Nonshockable Rhythm,” *New England Journal of Medicine*, vol. 381, pp. 2327–2337, Dec. 2019. Publisher: Massachusetts Medical Society _eprint: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1906661>.

- [202] U. Kaisers, K. P. Kelly, and T. Busch, "Liquid ventilation," *BJA: British Journal of Anaesthesia*, vol. 91, pp. 143–151, July 2003.
- [203] B. Rémy, G. Deby-Dupont, V. D'Ans, P. Ernest, *et al.*, "Substituts des globules rouges: émulsions de fluorocarbures et solutions d'hémoglobine," *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, vol. 18, pp. 211–224, Feb. 1999.
- [204] J. G. Riess, "Understanding the Fundamentals of Perfluorocarbons and Perfluorocarbon Emulsions Relevant to *In Vivo* Oxygen Delivery," *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, vol. 33, pp. 47–63, Jan. 2005.
- [205] H. W. Calderwood, B. C. Ruiz, M. K. Tham, J. H. Modell, *et al.*, "Residual levels and biochemical changes after ventilation with perfluorinated liquid," *Journal of Applied Physiology*, vol. 39, pp. 603–607, Oct. 1975.
- [206] T. F. Miller, B. Milestone, R. Stern, T. H. Shaffer, *et al.*, "Effects of perfluorochemical distribution and elimination dynamics on cardiopulmonary function," *Journal of Applied Physiology*, vol. 90, pp. 839–849, Mar. 2001. Publisher: American Physiological Society.
- [207] M. R. Wolfson and T. H. Shaffer, "Pulmonary applications of perfluorochemical liquids: Ventilation and beyond," *Paediatric Respiratory Reviews*, vol. 6, pp. 117–127, June 2005.
- [208] J. S. Greenspan, M. R. Wolfson, S. D. Rubenstein, and T. H. Shaffer, "Liquid ventilation of preterm baby," *Lancet (London, England)*, vol. 2, p. 1095, Nov. 1989.
- [209] R. M. Kacmarek, H. P. Wiedemann, P. T. Lavin, M. K. Wedel, *et al.*, "Partial Liquid Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome," *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, vol. 173, pp. 882–889, Apr. 2006. Publisher: American Thoracic Society - AJRCCM.
- [210] I. M. Galvin, A. Steel, R. Pinto, N. D. Ferguson, *et al.*, "Partial liquid ventilation for preventing death and morbidity in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome," *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, p. CD003707, July 2013.
- [211] P. Tarczy-Hornoch, J. Hildebrandt, T. Standaert, and J. C. Jackson, "Surfactant replacement increases compliance in premature lamb lungs during partial liquid ventilation in situ," *Journal of applied physiology*, 1998.
- [212] O. Avoine, D. Bossé, B. Beaudry, A. Beaulieu, *et al.*, "Total liquid ventilation efficacy in an ovine model of severe meconium aspiration syndrome," *Critical Care Medicine*, vol. 39, pp. 1097–1103, May 2011.
- [213] R. Robert, P. Micheau, S. Cyr, O. Lesur, *et al.*, "A prototype of volume-controlled tidal liquid ventilator using independent piston pumps," *ASAIO journal (American Society for Artificial Internal Organs: 1992)*, vol. 52, pp. 638–645, Dec. 2006.

- [214] T. H. Shaffer, D. L. Forman, and M. R. Wolfson, "Physiological effects of ventilation with liquid fluorocarbon at controlled temperatures," *Undersea Biomedical Research*, vol. 11, pp. 287–298, Sept. 1984.
- [215] D. L. Forman, V. K. Bhutani, N. Tran, and T. H. Shaffer, "A new approach to induced hypothermia," *Journal of Surgical Research*, vol. 40, pp. 36–42, Jan. 1986.
- [216] M. Nadeau, P. Micheau, R. Robert, O. Avoine, *et al.*, "Control of rapid hypothermia induction by total liquid ventilation: preliminary results," *Conference proceedings: ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, vol. 2013, pp. 3757–3760, 2013.
- [217] [U+FFFF] Tømte, T. Drægning, A. Mangschau, D. Jacobsen, *et al.*, "A comparison of intravascular and surface cooling techniques in comatose cardiac arrest survivors," *Critical Care Medicine*, vol. 39, pp. 443–449, Mar. 2011.
- [218] S. Jarrah, J. Dziadzio, C. Lord, G. L. Fraser, *et al.*, "Surface cooling after cardiac arrest: effectiveness, skin safety, and adverse events in routine clinical practice," *Neurocritical Care*, vol. 14, pp. 382–388, June 2011.
- [219] M. R. Wolfson, D. J. Malone, J. Wu, J. Hoffman, *et al.*, "Intranasal perfluorochemical spray for preferential brain cooling in sheep," *Neurocritical Care*, vol. 8, no. 3, pp. 437–447, 2008.
- [220] A. Hutin, F. Lidouren, M. Kohlhauer, L. Lotteau, *et al.*, "Total liquid ventilation offers ultra-fast and whole-body cooling in large animals in physiological conditions and during cardiac arrest," *Resuscitation*, vol. 93, pp. 69–73, Aug. 2015. Publisher: Elsevier.
- [221] R. Tissier, M. Chenoune, S. Pons, R. Zini, *et al.*, "Mild hypothermia reduces per-ischemic reactive oxygen species production and preserves mitochondrial respiratory complexes," *Resuscitation*, vol. 84, pp. 249–255, Feb. 2013. Publisher: Elsevier.
- [222] H. Soleimanpour, F. Rahmani, S. E. Goltari, and S. Safari, "Main Complications of Mild Induced Hypothermia after Cardiac Arrest: A Review Article," *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, vol. 6, no. 1, pp. 1–8, 2014.
- [223] M. Nadeau, M. Sage, M. Kohlhauer, J. Mousseau, *et al.*, "Optimal Control of Inspired Perfluorocarbon Temperature for Ultrafast Hypothermia Induction by Total Liquid Ventilation in an Adult Patient Model," *IEEE transactions on bio-medical engineering*, vol. 64, no. 12, pp. 2760–2770, 2017.
- [224] R. G. Geocadin, E. Wijidicks, M. J. Armstrong, M. Damian, *et al.*, "Practice guideline summary: Reducing brain injury following cardiopulmonary resuscitation," *Neurology*, vol. 88, pp. 2141–2149, May 2017.

- [225] P. J. Barnes, I. Adcock, M. Spedding, and P. M. Vanhoutte, "Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms," *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 14, pp. 436–441, Dec. 1993.
- [226] S. D. Mentzelopoulos, S. Malachias, C. Chamos, D. Konstantopoulos, *et al.*, "Vasopressin, Steroids, and Epinephrine and Neurologically Favorable Survival After In-Hospital Cardiac Arrest: A Randomized Clinical Trial," *JAMA*, vol. 310, pp. 270–279, July 2013.
- [227] T. Botnaru, T. Altherwi, and J. Dankoff, "Improved neurologic outcomes after cardiac arrest with combined administration of vasopressin, steroids, and epinephrine compared to epinephrine alone," *CJEM*, vol. 17, pp. 202–205, Mar. 2015.
- [228] M.-S. Tsai, C.-H. Huang, W.-T. Chang, W.-J. Chen, *et al.*, "The effect of hydrocortisone on the outcome of out-of-hospital cardiac arrest patients: a pilot study," *The American Journal of Emergency Medicine*, vol. 25, pp. 318–325, Mar. 2007.
- [229] H. Smithline, E. Rivers, T. Appleton, and R. Nowak, "Corticosteroid supplementation during cardiac arrest in rats," *Resuscitation*, vol. 25, pp. 257–264, June 1993.
- [230] M. W. Donnino, L. W. Andersen, K. M. Berg, M. Chase, *et al.*, "Corticosteroid therapy in refractory shock following cardiac arrest: a randomized, double-blind, placebo-controlled, trial," *Critical Care*, vol. 20, 2016.
- [231] M.-S. Tsai, P.-Y. Chuang, P.-H. Yu, C.-H. Huang, *et al.*, "Glucocorticoid use during cardiopulmonary resuscitation may be beneficial for cardiac arrest," *International Journal of Cardiology*, vol. 222, pp. 629–635, Nov. 2016.
- [232] U. S. Sandau and R. J. Handa, "Glucocorticoids exacerbate hypoxia-induced expression of the pro-apoptotic gene Bnip3 in the developing cortex," *Neuroscience*, vol. 144, pp. 482–494, Jan. 2007.
- [233] Q.-Y. Wang, P. Sun, Q. Zhang, and S.-L. Yao, "Minocycline attenuates microglial response and reduces neuronal death after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in mice," *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban*, vol. 35, pp. 225–229, Apr. 2015.
- [234] W. Wang, R. Lu, D.-y. Feng, L.-r. Liang, *et al.*, "Inhibition of microglial activation contributes to propofol [U+2010]induced protection against post [U+2010]cardiac arrest brain injury in rats," *Journal of Neurochemistry*, vol. 134, pp. 892–903, Sept. 2015. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd.
- [235] J. Yrjänheikki, T. Tikka, R. Keinänen, G. Goldsteins, *et al.*, "A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 96,

- pp. 13496–13500, Nov. 1999. Publisher: National Academy of Sciences Section: Biological Sciences.
- [236] J. M. Plane, Y. Shen, D. E. Pleasure, and W. Deng, “Prospects for Minocycline Neuroprotection,” *Archives of Neurology*, vol. 67, pp. 1442–1448, Dec. 2010. Publisher: American Medical Association.
- [237] A. Janata, I. A. Magnet, K. L. Schreiber, C. D. Wilson, *et al.*, “Minocycline fails to improve neurologic and histologic outcome after ventricular fibrillation cardiac arrest in rats,” *World Journal of Critical Care Medicine*, vol. 8, pp. 106–119, Nov. 2019.
- [238] G. Keilhoff, H. Schweizer, R. John, K. Langnaese, *et al.*, “Minocycline neuroprotection in a rat model of asphyxial cardiac arrest is limited,” *Resuscitation*, vol. 82, pp. 341–349, Mar. 2011.
- [239] Vemuganti Raghu, Dempsey Robert J., and Bowen Kellie K., “Inhibition of Intercellular Adhesion Molecule-1 Protein Expression by Antisense Oligonucleotides Is Neuroprotective After Transient Middle Cerebral Artery Occlusion in Rat,” *Stroke*, vol. 35, pp. 179–184, Jan. 2004. Publisher: American Heart Association.
- [240] Y. Kanemoto, H. Nakase, N. Akita, and T. Sakaki, “Effects of Anti-intercellular Adhesion Molecule-1 Antibody on Reperfusion Injury Induced by Late Reperfusion in the Rat Middle Cerebral Artery Occlusion Model,” *Neurosurgery*, vol. 51, pp. 1034–1042, Oct. 2002. Publisher: Oxford Academic.
- [241] J. Lehmsberg, J. Beck, A. Baethmann, and E. Uhl, “Effect of P-selectin inhibition on leukocyte-endothelium interaction and survival after global cerebral ischemia,” *Journal of Neurology*, vol. 253, pp. 357–363, Mar. 2006.
- [242] Mocco J., Choudhri Tanvir, Huang Judy, Harfeldt Elisabeth, *et al.*, “HuEP5C7 as a Humanized Monoclonal Anti-E/P-Selectin Neurovascular Protective Strategy in a Blinded Placebo-Controlled Trial of Nonhuman Primate Stroke,” *Circulation Research*, vol. 91, pp. 907–914, Nov. 2002. Publisher: American Heart Association.
- [243] K. J. Becker, “Anti-leukocyte Antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and Enlimomab (R6.5) in Acute Stroke,” *Current Medical Research and Opinion*, vol. 18, pp. s18–s22, Jan. 2002. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.1185/030079902125000688>.
- [244] G. Yilmaz, T. V. Arumugam, K. Y. Stokes, and D. N. Granger, “Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke,” *Circulation*, vol. 113, pp. 2105–2112, May 2006.
- [245] W. Li, H. Xu, and F. D. Testai, “Mechanism of Action and Clinical Potential of Fingolimod for the Treatment of Stroke,” *Frontiers in Neurology*, vol. 7, Aug. 2016.
- [246] A. Liesz, L. Sun, W. Zhou, S. Schwarting, *et al.*, “FTY720 Reduces Post-Ischemic Brain Lymphocyte Influx but Does Not Improve Outcome in Permanent Murine Cerebral Ischemia,” *PLoS ONE*, vol. 6, June 2011.

- [247] Kraft Peter, Göb Eva, Schuhmann Michael K., Göbel Kerstin, *et al.*, “FTY720 Ameliorates Acute Ischemic Stroke in Mice by Reducing Thrombo-Inflammation but Not by Direct Neuroprotection,” *Stroke*, vol. 44, pp. 3202–3210, Nov. 2013. Publisher: American Heart Association.
- [248] Y. Fu, N. Zhang, L. Ren, Y. Yan, *et al.*, “Impact of an immune modulator fingolimod on acute ischemic stroke,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, pp. 18315–18320, Dec. 2014.
- [249] Z. Zhu, Y. Fu, D. Tian, N. Sun, *et al.*, “Combination of an Immune Modulator Fingolimod with Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Pilot Trial,” *Circulation*, vol. 132, pp. 1104–1112, Sept. 2015.
- [250] R. P. Stroemer and N. J. Rothwell, “Cortical Protection by Localized Striatal Injection of IL-1ra Following Cerebral Ischemia in the Rat,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 17, pp. 597–604, June 1997. Publisher: SAGE Publications Ltd STM.
- [251] J. K. Relton, D. Martin, R. C. Thompson, and D. A. Russell, “Peripheral Administration of Interleukin-1 Receptor Antagonist Inhibits Brain Damage after Focal Cerebral Ischemia in the Rat,” *Experimental Neurology*, vol. 138, pp. 206–213, Apr. 1996.
- [252] H. Emsley, C. Smith, R. Georgiou, A. Vail, *et al.*, “A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients,” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, vol. 76, pp. 1366–1372, Oct. 2005.
- [253] Barone F. C., Arvin B., White R. F., Miller A., *et al.*, “Tumor Necrosis Factor- α ,” *Stroke*, vol. 28, pp. 1233–1244, June 1997. Publisher: American Heart Association.
- [254] K. L. Lambertsen, B. H. Clausen, A. A. Babcock, R. Gregersen, *et al.*, “Microglia Protect Neurons against Ischemia by Synthesis of Tumor Necrosis Factor,” *The Journal of Neuroscience*, vol. 29, pp. 1319–1330, Feb. 2009.
- [255] L. Marchetti, M. Klein, K. Schlett, K. Pfizenmaier, *et al.*, “Tumor Necrosis Factor (TNF)-mediated Neuroprotection against Glutamate-induced Excitotoxicity Is Enhanced by N-Methyl-D-aspartate Receptor Activation ESSENTIAL ROLE OF A TNF RECEPTOR 2-MEDIATED PHOSPHATIDYLINOSITOL 3-KINASE-DEPENDENT NF- κ B PATHWAY,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, pp. 32869–32881, July 2004. Publisher: American Society for Biochemistry and Molecular Biology.
- [256] S. Shaafi, E. Sharifipour, R. Rahmanifar, S. Hejazi, *et al.*, “Interleukin-6, a reliable prognostic factor for ischemic stroke,” *Iranian Journal of Neurology*, vol. 13, pp. 70–76, Apr. 2014.
- [257] Y. H. Tang, S. Vital, J. Russell, H. Seifert, *et al.*, “Interleukin-6 mediates enhanced thrombus development in cerebral arterioles following a brief period of focal brain ischemia,” *Experimental Neurology*, vol. 271, pp. 351–357, Sept. 2015.

- [258] M. H. Grønhøj, B. H. Clausen, C. D. Fenger, K. L. Lambertsen, *et al.*, “Beneficial potential of intravenously administered IL-6 in improving outcome after murine experimental stroke,” *Brain, Behavior, and Immunity*, vol. 65, pp. 296–311, Oct. 2017.
- [259] D. Bonifačić, A. Toplak, I. Benjak, V. S. Tokmadžić, *et al.*, “Monocytes and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) as early predictors of disease outcome in patients with cerebral ischemic stroke,” *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 128, pp. 20–27, Jan. 2016.
- [260] P. M. Hughes, P. R. Allegrini, M. Rudin, V. H. Perry, *et al.*, “Monocyte Chemoattractant Protein-1 Deficiency is Protective in a Murine Stroke Model,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, vol. 22, pp. 308–317, Mar. 2002. Publisher: SAGE Publications Ltd STM.
- [261] W. Fang, X. Zhai, D. Han, X. Xiong, *et al.*, “CCR2-dependent monocytes/macrophages exacerbate acute brain injury but promote functional recovery after ischemic stroke in mice,” *Theranostics*, vol. 8, pp. 3530–3543, June 2018.
- [262] Y.-P. Yan, K. A. Sailor, B. T. Lang, S.-W. Park, *et al.*, “Monocyte Chemoattractant Protein-1 Plays a Critical Role in Neuroblast Migration after Focal Cerebral Ischemia:,” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Dec. 2006. Publisher: SAGE PublicationsSage UK: London, England.
- [263] Y. Chen, J. M. Hallenbeck, C. Ruetzler, D. Bol, *et al.*, “Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells,” *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, vol. 23, pp. 748–755, June 2003.
- [264] R. Wang, X. Wu, J. Liang, Z. Qi, *et al.*, “Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood–brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion,” *International Journal of Neuroscience*, vol. 125, pp. 693–702, Sept. 2015. Publisher: Taylor & Francis _eprint: <https://doi.org/10.3109/00207454.2014.966354>.
- [265] A. K. Pandey, P. Bhattacharya, S. C. Shukla, S. Paul, *et al.*, “Resveratrol inhibits matrix metalloproteinases to attenuate neuronal damage in cerebral ischemia: a molecular docking study exploring possible neuroprotection,” *Neural Regeneration Research*, vol. 10, pp. 568–575, Apr. 2015.
- [266] B.-Q. Zhao, S. Wang, H.-Y. Kim, H. Storrie, *et al.*, “Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke,” *Nature Medicine*, vol. 12, pp. 441–445, Apr. 2006. Number: 4 Publisher: Nature Publishing Group.
- [267] F. D. Bilbao, D. Arsenijevic, T. Moll, I. Garcia [U+2010] Gabay, *et al.*, “In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in

- mice,” *Journal of Neurochemistry*, vol. 110, no. 1, pp. 12–22, 2009. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1471-4159.2009.06098.x>.
- [268] A. Liesz, A. Bauer, J. D. Hoheisel, and R. Veltkamp, “Intracerebral interleukin-10 injection modulates post-ischemic neuroinflammation: An experimental microarray study,” *Neuroscience Letters*, vol. 579, pp. 18–23, Sept. 2014.
- [269] P. A. Spera, J. A. Ellison, G. Z. Feuerstein, and F. C. Barone, “IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke,” *Neuroscience Letters*, vol. 251, pp. 189–192, July 1998.
- [270] [U+FFFF] Chamorro, S. Amaro, M. Vargas, V. Obach, *et al.*, “Interleukin 10, monocytes and increased risk of early infection in ischaemic stroke,” *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, vol. 77, pp. 1279–1281, Nov. 2006.
- [271] Pang Li, Ye Wen, Che Xiao-Ming, Roessler Blake J., *et al.*, “Reduction of Inflammatory Response in the Mouse Brain With Adenoviral-Mediated Transforming Growth Factor- β 1 Expression,” *Stroke*, vol. 32, pp. 544–552, Feb. 2001. Publisher: American Heart Association.
- [272] Kooijman Ron, Sarre Sophie, Michotte Yvette, and De Keyser Jacques, “Insulin-Like Growth Factor I,” *Stroke*, vol. 40, pp. e83–e88, Apr. 2009. Publisher: American Heart Association.
- [273] H. Kanzler, F. J. Barrat, E. M. Hessel, and R. L. Coffman, “Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists,” *Nature Medicine*, vol. 13, pp. 552–559, May 2007. Number: 5 Publisher: Nature Publishing Group.
- [274] T. V. Arumugam, E. Okun, S.-C. Tang, J. Thundyil, *et al.*, “TOLL-LIKE RECEPTORS IN ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY,” *Shock*, vol. 32, pp. 4–16, July 2009.
- [275] S.-C. Tang, T. V. Arumugam, X. Xu, A. Cheng, *et al.*, “Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, pp. 13798–13803, Aug. 2007.
- [276] A. Asmussen, K. Fink, H.-J. Busch, T. Helbing, *et al.*, “Inflammasome and toll-like receptor signaling in human monocytes after successful cardiopulmonary resuscitation,” *Critical Care*, vol. 20, p. 170, June 2016.
- [277] L. Xu, Q. Zhang, Q.-S. Zhang, Q. Li, *et al.*, “Improved Survival and Neurological Outcomes after Cardiopulmonary Resuscitation in Toll-like Receptor 4-mutant Mice,” *Chinese Medical Journal*, vol. 128, pp. 2646–2651, Oct. 2015.
- [278] P. M. Grace, K. Shimizu, K. A. Strand, K. C. Rice, *et al.*, “(+)-Naltrexone is neuroprotective and promotes alternative activation in the mouse hippocampus after cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation,” *Brain, behavior, and immunity*, vol. 48, pp. 115–122, Aug. 2015.

- [279] L. Liang, W. Shao, T. Shu, Y. Zhang, *et al.*, “Xuezhikang improves the outcomes of cardiopulmonary resuscitation in rats by suppressing the inflammation response through TLR4/NF- κ B pathway,” *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, vol. 114, p. 108817, June 2019.
- [280] S. Bergt, A. Grub, M. Mueller, R. Bajorat, *et al.*, “Toll-like receptor 4 deficiency or inhibition does not modulate survival and neurofunctional outcome in a murine model of cardiac arrest and resuscitation,” *PloS One*, vol. 14, no. 8, p. e0220404, 2019.
- [281] S. Bergt, A. Güter, A. Grub, N.-M. Wagner, *et al.*, “Impact of Toll-like receptor 2 deficiency on survival and neurological function after cardiac arrest: a murine model of cardiopulmonary resuscitation,” *PloS One*, vol. 8, no. 9, p. e74944, 2013.
- [282] T. Shichita, E. Hasegawa, A. Kimura, R. Morita, *et al.*, “Peroxisome oxidoreductase family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain,” *Nature Medicine*, vol. 18, pp. 911–917, June 2012.
- [283] S.-W. Kim, Y. Jin, J.-H. Shin, I.-D. Kim, *et al.*, “Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB1 phosphorylation and secretion,” *Neurobiology of Disease*, vol. 46, pp. 147–156, Apr. 2012.
- [284] Y. Kageyama, H. Suzuki, and T. Saruta, “Glycyrrhizin induces mineralocorticoid activity through alterations in cortisol metabolism in the human kidney,” *The Journal of Endocrinology*, vol. 135, pp. 147–152, Oct. 1992.
- [285] G. Hékimian, T. Baugnon, M. Thuong, M. Monchi, *et al.*, “CORTISOL LEVELS AND ADRENAL RESERVE AFTER SUCCESSFUL CARDIAC ARREST RESUSCITATION,” *Shock*, vol. 22, pp. 116–119, Aug. 2004.
- [286] S.-J. He, J. Cheng, X. Feng, Y. Yu, *et al.*, “The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer,” *Oncotarget*, vol. 8, pp. 64534–64550, Sept. 2017.
- [287] X. Shi, M. Li, K. Huang, S. Zhou, *et al.*, “HMGB1 binding heptamer peptide improves survival and ameliorates brain injury in rats after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation,” *Neuroscience*, vol. 360, pp. 128–138, Sept. 2017.
- [288] D. M. Agnew, R. C. Koehler, A.-M. Guerguerian, D. H. Shaffner, *et al.*, “Hypothermia for 24 hours after asphyxic cardiac arrest in piglets provides striatal neuroprotection that is sustained 10 days after rewarming,” *Pediatric Research*, vol. 54, pp. 253–262, Aug. 2003.
- [289] K. Möller, T. Stahl, J. Boltze, and D.-C. Wagner, “Isolation of inflammatory cells from rat brain tissue after stroke,” *Experimental & Translational Stroke Medicine*, vol. 4, p. 20, Oct. 2012.
- [290] G. Marraro, “TOTAL AND PARTIAL LIQUID VENTILATION USING PERFLUOROCARBONS,” vol. 12, Jan. 1996.

- [291] D. V. Azzopardi, B. Strohm, A. D. Edwards, L. Dyet, *et al.*, “Moderate Hypothermia to Treat Perinatal Asphyxial Encephalopathy,” *New England Journal of Medicine*, vol. 361, pp. 1349–1358, Oct. 2009. Publisher: Massachusetts Medical Society _eprint: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900854>.
- [292] S. E. Jacobs, C. J. Morley, T. E. Inder, M. J. Stewart, *et al.*, “Whole-Body Hypothermia for Term and Near-Term Newborns With Hypoxic-Ischemic Encephalopathy: A Randomized Controlled Trial,” *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, vol. 165, pp. 692–700, Aug. 2011. Publisher: American Medical Association.
- [293] J. D. S. Aridas, T. Yawno, A. E. Sutherland, I. Nitsos, *et al.*, “Detecting brain injury in neonatal hypoxic ischemic encephalopathy: closing the gap between experimental and clinical research,” *Experimental Neurology*, vol. 261, pp. 281–290, Nov. 2014.
- [294] C. Rey-Santano, V. E. Mielgo, E. Gastiasoro, F. J. Alvarez-Diaz, *et al.*, “Comparative effects of bronchoalveolar lavage with saline, surfactant, or perfluorocarbon in experimental meconium aspiration syndrome,” *Pediatric Critical Care Medicine: A Journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*, vol. 13, pp. e187–194, May 2012.
- [295] C. Y. Kuo, C. Hsueh, and C. R. Wang, “Liquid ventilation for treatment of meconium aspiration syndrome in a piglet model,” *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan Yi Zhi*, vol. 97, pp. 392–399, June 1998.
- [296] K. Kuboyama, P. Safar, A. Radovsky, S. A. Tisherman, *et al.*, “Delay in cooling negates the beneficial effect of mild resuscitative cerebral hypothermia after cardiac arrest in dogs: a prospective, randomized study,” *Critical Care Medicine*, vol. 21, pp. 1348–1358, Sept. 1993.
- [297] R. Tissier, H. Hocini, N. Tchitchek, N. Deye, *et al.*, “Early blood transcriptomic signature predicts patients’ outcome after out-of-hospital cardiac arrest,” *Resuscitation*, vol. 138, pp. 222–232, May 2019.
- [298] A. Cariou, N. Deye, B. Vivien, O. Richard, *et al.*, “Early High-Dose Erythropoietin Therapy After Out-of-Hospital Cardiac Arrest: A Multicenter, Randomized Controlled Trial,” *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 68, no. 1, pp. 40–49, 2016.
- [299] J. Zhang, G. B. Sadowska, X. Chen, S. Y. Park, *et al.*, “Anti-IL-6 neutralizing antibody modulates blood-brain barrier function in the ovine fetus,” *The FASEB Journal*, vol. 29, pp. 1739–1753, May 2015.
- [300] R. M. McLoughlin, B. J. Jenkins, D. Grail, A. S. Williams, *et al.*, “IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 9589–9594, July 2005.

- [301] Adrie Christophe, Adib-Conquy Minou, Laurent Ivan, Monchi Mehran, *et al.*, “Successful Cardiopulmonary Resuscitation After Cardiac Arrest as a “Sepsis-Like” Syndrome,” *Circulation*, vol. 106, pp. 562–568, July 2002.
- [302] S. Oda, H. Hirasawa, H. Shiga, K. Nakanishi, *et al.*, “Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis,” *Cytokine*, vol. 29, pp. 169–175, Feb. 2005.
- [303] J. T. Niemann, J. P. Rosborough, S. Youngquist, A. P. Shah, *et al.*, “Cardiac function and the proinflammatory cytokine response after recovery from cardiac arrest in swine,” *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, vol. 29, pp. 749–758, Nov. 2009.
- [304] J. H. Lee, E. J. Yoon, J. Seo, A. Kavoussi, *et al.*, “Hypothermia inhibits the propagation of acute ischemic injury by inhibiting HMGB1,” *Molecular Brain*, vol. 9, p. 81, Aug. 2016.
- [305] J.-B. Kim, J. S. Choi, Y.-M. Yu, K. Nam, *et al.*, “HMGB1, a Novel Cytokine-Like Mediator Linking Acute Neuronal Death and Delayed Neuroinflammation in the Postischemic Brain,” *Journal of Neuroscience*, vol. 26, pp. 6413–6421, June 2006.
- [306] L. Jiang, H. Feng, X. Chen, K. Liang, *et al.*, “Low Tidal Volume Reduces Lung Inflammation Induced by Liquid Ventilation in Piglets With Severe Lung Injury,” *Artificial Organs*, vol. 41, no. 5, pp. 440–445, 2017. _eprint: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/aor.12784>.
- [307] C. Demené, D. Maresca, M. Kohlhauer, F. Lidouren, *et al.*, “Multi-parametric functional ultrasound imaging of cerebral hemodynamics in a cardiopulmonary resuscitation model,” *Scientific Reports*, vol. 8, p. 16436, Nov. 2018. Number: 1 Publisher: Nature Publishing Group.
- [308] C. Kleinschnitz, N. Schwab, P. Kraft, I. Hagedorn, *et al.*, “Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation,” *Blood*, vol. 115, pp. 3835–3842, May 2010.
- [309] T. Shichita, Y. Sugiyama, H. Ooboshi, H. Sugimori, *et al.*, “Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury,” *Nature Medicine*, vol. 15, pp. 946–950, Aug. 2009.
- [310] V. Appay and S. L. Rowland-Jones, “RANTES: a versatile and controversial chemokine,” *Trends in Immunology*, vol. 22, pp. 83–87, Feb. 2001.
- [311] A. Awad, F. S. Taccone, M. Jonsson, S. Forsberg, *et al.*, “Time to intra-arrest therapeutic hypothermia in out-of-hospital cardiac arrest patients and its association with neurologic outcome: a propensity matched sub-analysis of the PRINCESS trial,” *Intensive Care Medicine*, vol. 46, pp. 1361–1370, July 2020.

- [312] C. W. Callaway, P. J. Coppler, J. Faro, J. S. Puyana, *et al.*, “Association of Initial Illness Severity and Outcomes After Cardiac Arrest With Targeted Temperature Management at 36 °C or 33 °C,” *JAMA network open*, vol. 3, p. e208215, July 2020.

Abstract

Out-of-hospital cardiac arrest is a major public health issue in western countries. In France, more than 40 000 events are registered every year with a high mortality rate among the initially resuscitated patients. After the return of a spontaneous circulation, patients indeed develop an ischemia-reperfusion syndrome, so-called post-cardiac arrest syndrome, leading to multi-organ failure and major neurological dysfunction. Because of these complications, the overall survival rate with good neurological outcome is inferior to 5% among the cardiac-arrest victims. Target body temperature management (between 33 to 36°C) is currently the main clinically available strategy to prevent the post-cardiac arrest syndrome. However, according to recent experimental and clinical data, the efficiency of this treatment is strongly dependent on the cooling delay after resuscitation. Thus, the host laboratory investigates an innovative strategy to improve survival and neurological outcomes in resuscitated patients through the induction of an ultra-fast whole-body cooling (32-34°C). It is based on the total liquid ventilation (TLV) of the lungs with cold perfluorocarbons, that allows to take advantage of their heat exchangers' potential, while maintaining normal gas exchanges. This approach provided promising cardio-, nephro- and neuroprotective effects in several animal models of global ischemia. The ultimate goal of the present study was to explore the mechanisms underlying this protection and contributing to the narrowness of the therapeutical window of hypothermia after cardiac arrest. Our investigations were focused on the inflammatory component of the post-cardiac-arrest syndrome. More precisely, we evaluated the effect of TLV on the release of one danger signal responsible for the immune activation following ischemia-reperfusion, *i.e.*, « High Mobility Group Box 1 » (HMGB1). First, we determined the optimal ventilatory settings in order to preserve lung integrity while harnessing the full protective potential of the TLV procedure. Thus, the host laboratory elaborated a new « lung conservative liquid ventilation » strategy through the incomplete filling of lungs with perfluorocarbons. Second, we evaluated the early cell death and subsequent activation of innate immune pathways in animals treated by hypothermic TLV, in a rabbit model of ventricular fibrillation. Our results showed that despite a lack of effect on HMGB1 release, TLV was able to transiently mitigate the inflammatory response triggered by cardiac arrest. It suggested a predominant role for the acute humoral response in the propagation of neuronal damage during the post-cardiac arrest syndrome. Third, in order to precise the importance of HMGB1 in these post-resuscitative lesions, we also examined the neuroprotective effect of its pharmacological inhibition through glycyrrhizin administration in the same rabbit model. Thus, we showed that HMGB1 blockade was associated with improvement of the neurological recovery and reduction of hemodynamic failure caused by cardiac arrest. These effects seemed to partly rely on a rather specific inhibition of lymphocytes activation and mobilization. The inflammatory syndrome following cardiac arrest may therefore involve selective immune pathways that contribute to the patients' neurological outcome.

Résumé

L'arrêt cardiaque extrahospitalier constitue un enjeu majeur de santé publique dans les pays industrialisés. Près de 40 000 cas sont par exemple dénombrés chaque année en France. Malgré l'amélioration des soins pré-hospitaliers et la reprise fréquente d'une activité cardiaque spontanée, la mortalité de ces patients reste considérable. Après la réanimation des patients, le syndrome d'ischémie-reperfusion est en effet à l'origine d'une défaillance multiviscérale associée à des dommages cérébraux sévères. Ces manifestations sont regroupées sous le terme de syndrome post-arrêt cardiaque. Ainsi, moins de 5% des patients survivent plus de 3 mois avec une bonne récupération neurologique après un arrêt cardiaque. Le principal traitement ayant fait la preuve de son efficacité clinique pour limiter le syndrome post-arrêt cardiaque consiste à assurer un contrôle ciblé de la température corporelle entre 33 et 36°C. Néanmoins, des données expérimentales et cliniques indiquent que le délai d'induction du refroidissement après la réanimation conditionne grandement son effet neuroprotecteur. Dans ce contexte, le laboratoire d'accueil étudie une stratégie susceptible d'améliorer la survie et la récupération neurologique au décours de la réanimation grâce à l'induction d'une hypothermie généralisée ultra-rapide (32-34°C). Ils proposent pour cela d'utiliser les poumons comme bio-échangeurs thermiques tout en maintenant des échanges gazeux normaux par une ventilation liquide totale (VLT) avec des perfluorocarbones. Expérimentalement, cette stratégie a démontré de puissants effets cardio-, neuro- et néphroprotecteurs dans divers modèles animaux d'ischémie généralisée. L'objectif de mes travaux de thèse était d'étudier les mécanismes sous-tendant ces effets et conditionnant la fenêtre d'efficacité de l'hypothermie après un arrêt cardiaque. Nous nous sommes plus précisément intéressés aux effets de la VLT sur la composante inflammatoire du syndrome post-arrêt cardiaque, en étudiant un élément initiateur de cette réponse, la « High Mobility Group Box 1 » (HMGB1). Nous avons tout d'abord mené une étude visant à définir les paramètres de VLT offrant le meilleur rapport tolérance/efficacité. Le laboratoire a ainsi mis au point une nouvelle méthode de « lung conservative liquid ventilation » basée sur un remplissage incomplet des poumons avec les perfluorocarbones. Nous avons ensuite évalué l'effet de la VLT sur la mortalité cellulaire précoce et l'activation immunitaire au cours de la phase aiguë du syndrome post-arrêt cardiaque. Nos travaux ont permis de montrer que, malgré l'absence de protection vis-à-vis de la libération de HMGB1 induite par l'arrêt cardiaque, la VLT permettait de moduler de façon transitoire la réponse humorale précoce qui en découle et qui contribuerait à la propagation des lésions tissulaires. Enfin, nous avons évalué le potentiel neuroprotecteur de l'inhibition pharmacologique de HMGB1 après la réanimation par une administration de glycyrrhizine. Ce traitement a également permis une réduction des séquelles neurologiques et de la défaillance hémodynamique induites par l'arrêt cardiaque. Une partie de ces effets protecteurs semblait médiée par une inhibition spécifique de la réponse lymphocytaire. Le syndrome inflammatoire consécutif à l'arrêt cardiaque apparaît donc complexe et semble mettre en jeu des voies relativement spécifiques contribuant *in fine* la détérioration du pronostic neurologique.