



Mécanismes arythmogènes dans le ventricule droit sain et dans la dysfonction ventriculaire droite

Virginie Dubes

► To cite this version:

Virginie Dubes. Mécanismes arythmogènes dans le ventricule droit sain et dans la dysfonction ventriculaire droite. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0050 . tel-01516294

HAL Id: tel-01516294

<https://theses.hal.science/tel-01516294>

Submitted on 30 Apr 2017

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOLOGIE CELLULAIRE, PHYSIOLOGIE ET PATHOLOGIE

Par Virginie DUBES

**Mécanismes arythmogènes dans le ventricule droit sain et
dans la dysfonction ventriculaire droite**

Sous la direction du Professeur Olivier BERNUS

Soutenue le 29 Avril 2016

Membres du jury :

M. THAMBO Jean-Benoît
M. BOIS Patrick
M. LE GUENNEC Jean-Yves
M. WHITE Edward

Professeur, Université de Bordeaux
Professeur, Université de Poitiers
Professeur, Université de Montpellier
Professeur, Université de Leeds

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur

Mécanismes arythmogènes dans le ventricule droit sain et dans la dysfonction ventriculaire droite.

Résumé : Le ventricule droit (VD) possède une embryogénèse, une géométrie et des propriétés biomécaniques différentes du ventricule gauche (VG). L'infundibulum pulmonaire (RVOT) est une origine fréquente d'arythmies dans le VD sain ou pathologique. La tétralogie de Fallot (TOF) est la cardiopathie congénitale cyanogène la plus fréquente et est associée à une dysfonction du VD. Si la correction chirurgicale a augmenté l'espérance de vie des patients TOF, à l'âge adulte les séquelles chirurgicales du VD et RVOT conduisent souvent à une insuffisance cardiaque, des arythmies voire la mort subite cardiaque. Les objectifs de cette thèse sont de : (i) définir les propriétés électrophysiologiques et structurelles du VD sain chez le cochon et (ii) caractériser le remodelage arythmogène des ventricules dans un modèle porcin de réparation de TOF (rTOF). Nous avons démontré la présence d'une hétérogénéité de repolarisation et de conduction dans le VD sain en lien avec un profil d'expression spécifique des canaux ioniques dans le RVOT sub-épicaire. Une approche histologique a également permis de mettre en évidence une structure tissulaire spécifique au RVOT contribuant au ralentissement de l'activation de cette région. Les cœurs des cochons rTOF témoignent d'un remodelage électrophysiologique et structurel pro-arythmique du VD caractérisé par une dispersion de la repolarisation, et un ralentissement de la conduction corrélé à un remodelage moléculaire et structurel. Nous décrivons également la présence d'un remodelage arythmogène distinct dans le VG rTOF sur le plan électrique et structurel sans modification des propriétés hémodynamiques. En conclusion, ces travaux révèlent la présence de substrats arythmogènes du VD sain et un profond remodelage pro-arythmique dans les ventricules rTOF.

Mots clés : infundibulum pulmonaire, tétralogie de Fallot, mort subite

Arrhythmic mechanisms in the healthy right ventricle and in RV dysfunction.

Abstract : The right ventricle (RV) has different embryologic history, geometry and biomechanics properties compared to the left ventricle (LV). The right ventricular outflow tract (RVOT) is a common arrhythmia origin in the healthy or pathological RV. Tetralogy of Fallot (TOF) is the most frequent cyanotic congenital heart disease and is associated with RV dysfunction. Surgical correction has significantly increased patient's life expectancy but surgical lesions often lead to heart failure, arrhythmias even sudden cardiac death in adulthood. The aims of this work are to: (i) define RVOT electrophysiological and structural properties in the healthy pig and (ii) characterize a potential arrhythmogenic remodeling in both ventricles in a porcine model mimicking repaired TOF (rTOF). We showed the presence of repolarization and conduction heterogeneities in the healthy RV in relation to a specific ion channel expression profile in the RVOT epicardium. Moreover, an histological approach highlighted the presence of a specific tissue structure likely to contribute to the slow conduction observed in this region. A pro-arrhythmic electrophysiological and structural remodeling was found in the RV of rTOF pigs. This remodeling was characterized by an increased dispersion of repolarization and slower conduction properties which were linked to a molecular and structural remodeling. Interestingly, we also described a distinct electrical and structural arrhythmogenic remodeling in the rTOF LV in the absence of hemodynamic alteration. To conclude, this work revealed the presence of an arrhythmogenic substrate within the healthy RV and a profound arrhythmogenic remodeling of both ventricles in rTOF.

Keywords : pulmonary infundibulum, tetralogy of Fallot, sudden cardiac death

IHU Liryc, Inserm U1045

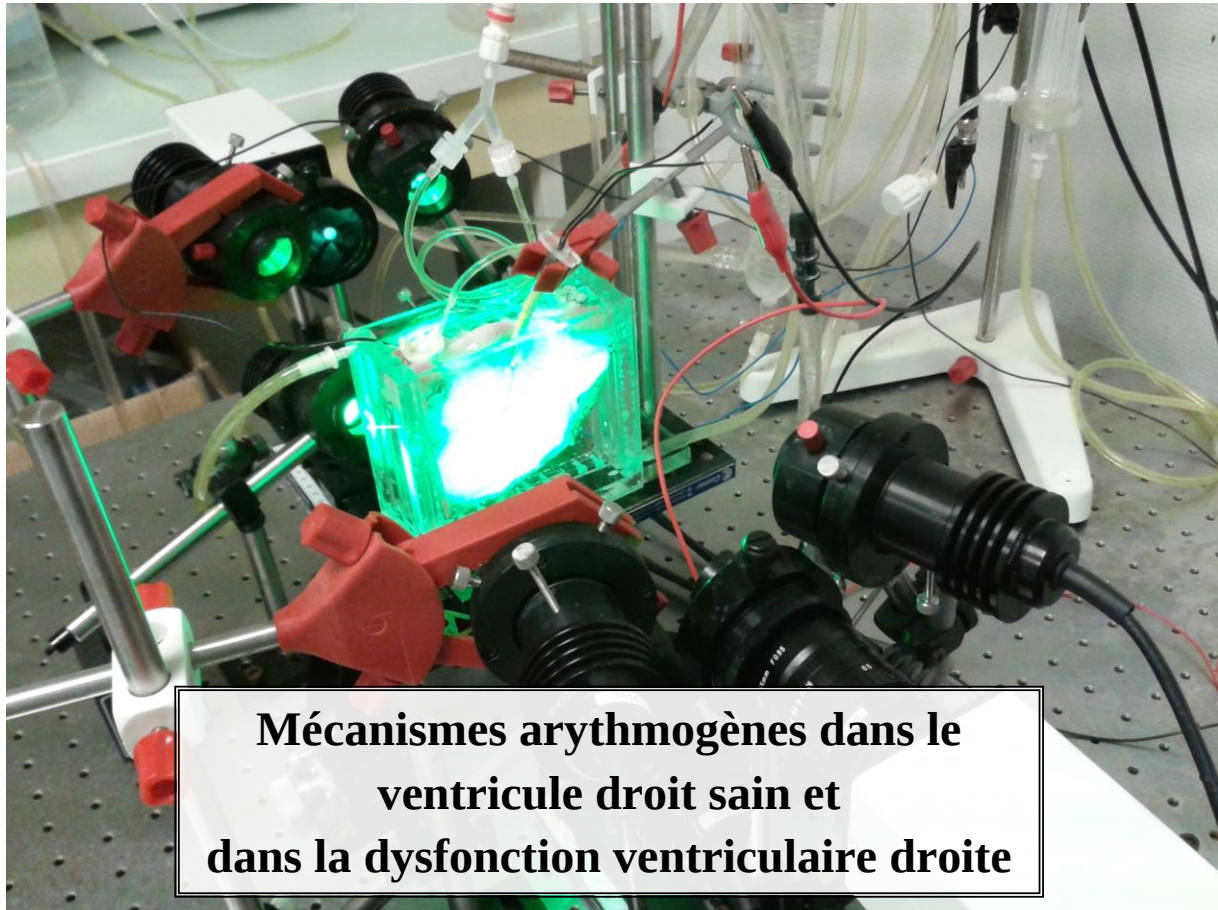
Institut de rythmologie et de modélisation cardiaque, Inserm U1045

Avenue du Haut Lévêque 33600 Pessac

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité Biologie Cellulaire, Physiopathologie et Pathologie



Thèse présentée et soutenue le 29 Avril 2016

Par **Virginie DUBES**

Membres du jury:

M. THAMBO Jean-Benoît
M. BOIS Patrick
M. LE GUENNEC Jean-Yves
M. WHITE Edward
M. BERNUS Olivier

Professeur des Universités, Université de Bordeaux
Professeur des Universités, Université de Poitiers
Professeur des Universités, Université de Montpellier
Professeur des Universités, Université de Leeds, Royaume-Uni
Professeur des Universités, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

A ma famille

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	IX
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	XIII
LISTE DES FIGURES.....	XVII
LISTE DES TABLEAUX.....	XXI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XXIII
RÉSUMÉ.....	XXIX
INTRODUCTION.....	3
I/ Généralités sur le cœur : de l'anatomie à la fonction.....	3
1. Le cœur dans son anatomie et sa structure.....	3
a) <i>Embryologie du cœur</i>	3
b) <i>Anatomie du cœur</i>	8
c) <i>La paroi cardiaque</i>	9
d) <i>Morphologie des cavités cardiaques : les ventricules</i>	10
2. La composition histologique du tissu musculaire cardiaque : le myocarde.....	13
a) <i>Les cellules musculaires</i>	14
b) <i>Les cellules non-musculaires</i>	16
3. Le cœur dans sa fonction : la pompe cardiaque.....	21
a) <i>La circulation systémique</i>	21
b) <i>La circulation pulmonaire</i>	22
c) <i>La circulation coronarienne</i>	23
d) <i>Cycle cardiaque</i>	25
II/ Activité électrique du cœur.....	27
1. Le potentiel d'action cardiaque.....	28
a) <i>Définition</i>	28
b) <i>Potentiel d'action ventriculaire</i>	29
c) <i>Hétérogénéité des potentiels d'action au sein du myocarde ventriculaire</i>	33
d) <i>Adaptation de la durée du potentiel d'action à la fréquence cardiaque</i>	35
e) <i>Période réfractaire</i>	35
2. Automatisme et système de conduction cardiaque.....	37
a) <i>A l'échelle du cœur entier</i>	37
b) <i>A l'échelle cellulaire : rôle des disques intercalaires</i>	38

c) <i>Mesure de l'activité électrique du cœur</i>	42
3. Genèse des arythmies cardiaques.....	43
a) <i>Automatismes cardiaques anormaux</i>	45
b) <i>Activités déclenchées</i>	46
c) <i>Troubles de conduction et du rythme</i>	48
III/ Couplage Excitation-Contraction	49
1. Le sarcomère : structure élémentaire et fonctionnelle du cardiomyocyte	49
2. Bases structurales du couplage excitation-contraction	54
a) <i>Les tubules transverses</i>	55
b) <i>Le réticulum sarcoplasmique</i>	56
3. Dynamique.....	59
IV/ Pathologies arythmogènes du ventricule droit	61
1. Tachycardie ventriculaire idiopathique.....	61
a) <i>Les tachycardies ventriculaires idiopathiques infundibulaires</i>	62
b) <i>Les tachycardies ventriculaires idiopathiques fasciculaires</i>	63
2. Syndrome de Brugada.....	63
3. Dysplasie arythmogène du ventricule droit	69
4. Insuffisance cardiaque droite.....	73
a) <i>Physiopathologie</i>	73
b) <i>Remodelage électrophysiologique</i>	76
c) <i>Remodelage du CEC</i>	78
d) <i>Mécanismes arythmogènes</i>	80
e) <i>Traitements</i>	81
5. Cardiomyopathie congénitale : Tétralogie de Fallot.....	82
a) <i>Aspects anatomiques de la pathologie</i>	83
b) <i>Aspects embryologiques de la pathologie</i>	85
c) <i>Aspects génétiques de la pathologie</i>	86
d) <i>Signes cliniques</i>	88
e) <i>Examens cliniques et diagnostiques</i>	89
f) <i>Traitement médical et chirurgie réparatrice</i>	90
g) <i>Evolution post-opératoire</i>	93
OBJECTIFS	101
MATÉRIEL ET MÉTHODES	107
I/ Expérimentation animale sur modèle porcin	107
1. Cochons sains.....	107

2. Le modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée.....	108
3. Caractérisation du modèle par analyse IRM.....	109
II/ Enregistrements de Potentiels d'Action Monophasiques <i>in vivo</i>.....	110
III/ Techniques d'isolement et de perfusion du tissu cardiaque.....	111
1. Cœur entier.....	111
2. Préparations ventriculaires.....	112
IV/ Enregistrements de Potentiels d'Action optiques <i>ex vivo</i>: la cartographie optique.....	115
1. Généralités.....	115
2. Sondes sensibles au potentiel membranaire.....	116
3. Dispositif expérimental.....	118
4. Protocoles expérimentaux.....	121
<i>a) Protocole de restitution.....</i>	<i>121</i>
<i>b) Protocole S1-S2.....</i>	<i>122</i>
5. Analyses des données.....	122
V/ Isolement des cardiomyocytes ventriculaires.....	123
VI/ Mesure simultanée du calcium et de la contraction cellulaire.....	124
1. Sonde calcique.....	124
2. Dispositif et protocoles expérimentaux.....	126
<i>a) Mesure des transitoires calciques.....</i>	<i>127</i>
<i>b) Mesure du raccourcissement des sarcomères.....</i>	<i>128</i>
3. Analyses des données.....	129
<i>a) Mesure du calcium intracellulaire par spectrofluorimétrie.....</i>	<i>129</i>
<i>b) Mesure du raccourcissement des sarcomères.....</i>	<i>129</i>
VII/ Histologie.....	130
1. Préparation des tissus : marquage au trichrome de Masson.....	130
<i>a) Fixation.....</i>	<i>130</i>
<i>b) Déshydratation-imprégnation.....</i>	<i>130</i>
<i>c) Inclusion-coupe.....</i>	<i>131</i>
<i>d) Coloration.....</i>	<i>131</i>
<i>e) Quantification de la fibrose.....</i>	<i>132</i>
2. Immunocytochimie.....	132
<i>a) Principe.....</i>	<i>132</i>
<i>b) Immunofluorescence sur cardiomyocytes ventriculaires.....</i>	<i>134</i>

c) Immunofluorescence sur coupe tissulaire de ventricules.....	135
d) Immunoenzymologie sur coupe tissulaire de ventricules.....	135
3. Marquage des lipides par l'huile rouge.....	137
4. Technique de Microscopie.....	138
a) Principe de la microscopie à épifluorescence.....	138
b) Principe de la microscopie confocale.....	139
5. Marquage des tubules T.....	140
VIII/ Biologie moléculaire.....	142
1. Extraction des protéines.....	142
2. Western Blot.....	143
IX/ Tests statistiques.....	144
RESULTATS ET DISCUSSION.....	149
Première étude : Hétérogénéité des propriétés de conduction et de repolarisation au sein du ventricule droit de cochon.....	149
I/ Contexte et objectifs.....	149
II/ Résultats.....	151
1. Propriétés de repolarisation.....	151
a) Caractérisation <i>in vivo</i>	151
b) Caractérisation <i>ex vivo</i> sur cœur entier.....	151
c) Caractérisation <i>ex vivo</i> sur préparation ventriculaire RVOT-VD.....	152
d) Expression des canaux potassiques.....	157
e) Gradient transmural.....	158
2. Propriétés d'activation.....	159
3. Vitesses de conduction.....	159
4. Composante structurelle du VD.....	163
a) Fibrose.....	163
b) Tissu adipeux.....	165
c) Orientation des fibres myocardiques.....	167
5. Caractéristiques à l'échelle cellulaire.....	168
a) Taille des cellules.....	168
b) Tubules Transverses.....	169
c) Couplage Excitation-Contraction sur cardiomyocytes isolés.....	170
III/ Discussion des résultats.....	171

Deuxième étude : Remodelage pro-arythmique des ventricules droit et gauche dans un modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée.....	174
I/ Contexte et objectifs.....	174
II/ Article 1 : Le remodelage pro-arythmique du ventricule droit dans un modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée.....	175
III/ Article 2 : Substrat arythmogène dans le ventricule gauche d'un modèle porcin mimant la tétralogie de Fallot.....	212
IV/ Résultats supplémentaires.....	238
1. Gradients inter-ventriculaires d'APD.....	238
2. Immunomarquages.....	239
a) <i>Le canal K_v4.3</i>	239
b) <i>La Connexine 43</i>	240
3. Organisation du réseau de tubules T.....	242
V/ Discussion des résultats.....	243
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	249
BIBLIOGRAPHIE.....	255
ANNEXES.....	281

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont été effectués au sein de l'Institut de Rythmologie et de modélisation Cardiaque (IHU LIRYC), Unité 1045 de l'Inserm de Bordeaux sous la direction du Professeur Olivier BERNUS, Directeur scientifique de l'IHU.

Je remercie monsieur le Professeur Olivier BERNUS pour son accueil au sein de son équipe et pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse. Tu m'as fait confiance tout au long de mon projet et je t'en remercie. Merci de m'avoir accompagnée au Centre de recherche multidisciplinaire de cardiologie à l'université de Leeds afin de visiter le laboratoire du Professeur Edward WHITE. Je te remercie de m'avoir donné la chance d'exposer mes travaux durant les congrès scientifiques internationaux.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur le Professeur Roger MARTHAN pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire INSERM U1045. Je tiens à vous exprimer ma reconnaissance pour l'orientation dans le choix de cette thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Michel HAÏSSAGUERRE pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe d'électrophysiologie cardiaque du laboratoire.

Je tiens à remercier également Messieurs les Professeurs Patrick BOIS et Jean-Yves LE GUENNEC d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

J'exprime également ma gratitude aux Messieurs les Professeurs Jean-Benoît THAMBO et Edward WHITE pour avoir si gentiment accepté de participer au jury de cette thèse.

J'adresse tout particulièrement au Docteur David BENOIST mes plus sincères remerciements. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée au cours de ces trois années. Toujours disponible lorsque je venais te voir à ton bureau, tu m'as encadrée et guidée durant mes travaux. Tu m'as permis de mener à bien cette thèse et tu m'as rassurée dans les moments de doute, je suis profondément reconnaissante de ton soutien et de ton amitié. Tes précieux conseils et tes connaissances scientifiques me manqueront.

Je remercie le Professeur Jean-Benoît THAMBO et le Docteur François ROUBERTIE pour la réalisation de notre modèle porcin de tétralogie Fallot réparée.

Merci pour vos différentes implications au projet et pour les discussions scientifiques à l'hôpital sur cette pathologie et son évolution post-opératoire.

Je tiens à remercier le Professeur Edward WHITE pour sa sympathie et pour sa collaboration dans la réalisation de ce travail notamment pour le projet RVOT. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire durant trois jours et de m'avoir permis de faire une présentation de mon travail devant votre équipe de recherche.

Je remercie également le Professeur Ruben CORONEL et Charly BELTERMAN pour leur aide et leur collaboration dans le projet RVOT.

Je remercie toutes les personnes qui ont croisé ma route au laboratoire :

Le Docteur Thomas DESPLANTEZ pour son soutien, sa gentillesse et ses nombreux conseils qui furent précieux. J'ai apprécié nos discussions scientifiques autour de ton domaine de recherche « les connexines » mais aussi sur les bandes dessinées.

Marion CONSTANTIN, pour ta générosité et ta bonne humeur qui furent précieuses durant ces trois années. Nous sommes arrivées ensemble au laboratoire en 2012, où nous avons dû prendre nos marques dans un domaine de recherche que nous ne connaissions pas. Nous avons appris ensemble et une belle amitié est née. Tu m'as soutenue dans les bons comme les mauvais moments et je t'en remercie. Je te souhaite beaucoup de réussite pour la suite.

Le Docteur Caroline ROORYCK-THAMBO et Sabine CHARRON pour leur gentillesse et leurs conseils. Vous m'avez accueillie dans votre laboratoire : l'Equipe d'Accueil 4137, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme, afin de me former au Western Blot. Sabine, je te remercie pour ta collaboration sur les RT-PCR et les micros array.

Les Docteurs Stephen GUILBERT, Delphine ELBES, et Julie MAGAT pour leur contribution à la réalisation des séquences IRM ainsi que pour leur bonne humeur.

Samantha ROQUES et Martine RENARD pour m'avoir permis d'utiliser le plateau d'histologie de la Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale (PTIB). Merci pour vos conseils, votre générosité et gentillesse.

Merci à Corentin et Sébastien pour leur gentillesse et leur soutien. Vous êtes adorables.

J'exprime également ma gratitude et mon amitié à mes chers collègues doctorants du laboratoire.

Une belle pensée pour Delphine et Virginie avec qui j'ai apprécié travailler. Toujours de bonne humeur le matin et de bonnes heures.

Delphine et Sophie, nos secrétaires indispensables à la vie du laboratoire, je vous remercie pour vos sourires, votre gentillesse et soutien.

Je remercie toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont prodigué conseils et support tout au long de mon projet.

Je remercie ma famille de m'avoir soutenue durant toutes ces années et d'avoir cru en moi. Ma sœur Sandra, tu as toujours été présente pour moi, tu m'as écoutée et tu m'as conseillée dans mes choix. Maintenant c'est à toi de commencer cette belle aventure et je te souhaite de réussir et de t'épanouir dans le monde de la recherche.

Maman Fabienne, Papa Didier, vous avez toujours été présents pour moi à chaque étape de ma vie, je vous dois tellement. Merci pour l'éducation que vous m'avez donnée. Vous m'avez appris à donner le meilleur de moi-même et à être courageuse malgré la difficulté. Vous êtes mes modèles et j'espère que vous serez fiers de moi.

Mes grands-parents, merci pour votre soutien et votre amour éternel.

Mamie Reine, tu es partie rejoindre les étoiles il y a peu, et je mettrai toutes mes forces à réaliser mes projets afin que tu sois fière de moi.

Pour finir, je souhaiterais remercier la personne qui partage ma vie Yoann. Ton amour et ton soutien quotidien m'ont aidé à tenir moralement durant ces trois ans. Tu m'as donné le courage et la force de ne pas baisser les bras.

LISTES DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles

Identification of region-specific myocardial gene expression patterns in a chronic swine model of repaired tetralogy of Fallot.

Charron S, Roubertie F, Benoist D, **Dubés V**, Gilbert SH, Constantin M, Vieillot D, Elbes D, Quesson B, Bordachar P, Haïssaguerre M, Bernus O, Thambo J-B, Rooryck-Thambo C.

PLoS One 2015 Aug 7; 10 (8) e0134146.

Pro-arrhythmic substrate in the right ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Benoist* D, **Dubés* V**, Roubertie F, Gilbert SH, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Quesson B, Cochet H, Haïssaguerre M, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Thambo J-B, Bernus O.

En soumission.

Arrhythmogenic remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés* V, Benoist* D, Roubertie F, Gilbert SH, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Quesson B, Cochet H, Haïssaguerre M, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Thambo J-B, Bernus O.

En soumission.

Communications (Posters)

Electrophysiological and structural remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés V, Benoist D, Roubertie F, Gilbert SH, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Charron S, Cochet H, Quesson B, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

Journée TecSan, Bordeaux, France (2013). Prix Poster.

Pro-arrhythmic ventricular remodeling in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés V, Benoist D, Roubertie F, Gilbert SH, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Charron S, Cochet H, Quesson B, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

Printemps de la cardiologie, Strasbourg, France (2014). Prix Poster.

Pro-arrhythmic substrate in the right ventricle of a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Benoist D, **Dubés V**, Roubertie F, Gilbert S, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Charron S, Cochet H, Quesson B, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

Heart Rhythm, San Francisco, Etats-Unis (2014).

Slow and discontinuous conduction in the right ventricular outflow tract.

Benoist D, **Dubés V**, Charron S, Gilbert SH, Belterman C, Constantin M, Naulin J, Magat J, Ozenne V, Haïssaguerre M, Coronel R, Bernus O.

Heart Rhythm, Boston, Etats-Unis (2015).

Action potential shortening in the pig right ventricular outflow tract epicardium.

Dubés V, Charron S, Belterman C, Rooryck-Thambo C, White E, Haïssaguerre M, Coronel R, Bernus O, Benoist D.

Printemps de la cardiologie, Toulouse, France (2015).

Heterogeneous ventricular repolarization in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés V, Benoist D, Roubertie F, Constantin M, Vieillot D, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

ISHR, Bordeaux, France (2015).

Heterogeneous conduction and repolarization properties in the pig right ventricle.

Benoist D, **Dubés V**, Charron S, Belterman C, Constantin M, Ozenne V, Magat J, Gilbert SH, Naulin J, Rooryck-Thambo C, Quesson B, Haïssaguerre M, White E, Coronel R, Bernus O.

ISHR, Bordeaux, France (2015).

Communications orales

Electrophysiological and structural remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés V, Benoist D, Roubertie F, Gilbert S, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Charron S, Cochet H, Quesson B, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

Journée TecSan, Bordeaux, France (2013).

Electrophysiological and structural remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Dubés V, Benoist D, Roubertie F, Gilbert S, Constantin M, Elbes D, Vieillot D, Charron S, Cochet H, Quesson B, Rooryck-Thambo C, Bordachar P, Haïssaguerre M, Thambo J-B, Bernus O.

Heart Rhythm, San Francisco, Etats-Unis (2014).

Arrhythmic mechanisms in the healthy right ventricle and in right ventricle dysfunction.

Dubés V, Benoist D, Charron S, Belterman C, Constantin M, Gilbert S, Rooryck-Thambo C, Quesson B, Haïssaguerre M, White E, Coronel R, Bernus O.

Séminaire au sein du Centre de recherche multidisciplinaire de cardiologie à l'université de Leeds, Royaume-Uni (2015).

LISTES DES FIGURES

Figure 1. Etape du développement embryonnaire cardiaque chez l’Homme.	7
Figure 2. Formation de la boucle cardiaque « Looping ».	7
Figure 3. Anatomie de la face antérieure du cœur en coupe transversale.	8
Figure 4. Structure de la paroi cardiaque.	9
Figure 5. Aspect morphologique de la cavité du ventricule droit.	11
Figure 6. Aspect morphologique de la cavité du ventricule gauche.	12
Figure 7. Composition histologique du tissu myocardique.	14
Figure 8. Cardiomyocytes ventriculaires de cochon.	15
Figure 9. Représentation de coupes histologiques de myocarde de VG de lapin (x40).	15
Figure 10. Tissu adipeux cardiaque.	20
Figure 11. Circulation sanguine générale.	21
Figure 12. Echanges alvéolo-capillaires lors de la circulation pulmonaire.	23
Figure 13. Représentation anatomique de la vascularisation coronarienne du cœur.	24
Figure 14. Diagramme de Wiggers.	26
Figure 15. Représentation schématique du PA d'un cardiomyocyte ventriculaire.	30
Figure 16. Régionalisation des PAs issus de myocytes ventriculaires.	33
Figure 17. Représentation schématique de la période réfractaire d'un cardiomyocyte ventriculaire.	36
Figure 18. Système de conduction électrique du coeur.	37
Figure 19. Représentation des jonctions communicantes.	39
Figure 20. Expression des Cxs cardiaques dans le coeur sain de mammifère adulte.	40
Figure 21. Représentation schématique d'un ECG.	43
Figure 22. Exemples d'arythmies cardiaques.	44
Figure 23. Triangle de Coumel.	45
Figure 24. Représentation de post-dépolarisations précoces et tardives.	47

Figure 25. Modèle de réentrée dans les fibres de Purkinje.	48
Figure 26. Organisation structurale du sarcomère.	50
Figure 27. Principales protéines constitutives des myofilaments.	51
Figure 28. Composition de la protéine de myosine.	53
Figure 29. Représentation schématique d'une dyade.....	54
Figure 30. Domaines fonctionnels de RyR2.	58
Figure 31. Couplage excitation-contraction de cardiomyocytes ventriculaires.	60
Figure 32. Cycle de la contraction musculaire.	61
Figure 33. Exemple d'un ECG de patient atteint du syndrome de Brugada.	65
Figure 34. Modèle représentant l'hypothèse de la repolarisation précoce dans le syndrome de Brugada.	67
Figure 35. Modèle représentant l'hypothèse de la dépolarisation tardive dans le syndrome de Brugada.	68
Figure 36. Infiltration adipeuse et fibrose dans le cas de la DAVD.	69
Figure 37. Exemple d'enregistrement ECG d'un patient atteint de DAVD.	70
Figure 38. Evolution de la paroi myocardique au cours de la mise en place de l'IC.	75
Figure 39. Composante ionique participant au PA ventriculaire d'un mammifère atteint de l'IC.	77
Figure 40. Mécanismes impliqués dans l'altération de l'homéostasie calcique dans un contexte d'ICG.	80
Figure 41. Mécanismes arythmogènes à l'échelle cellulaire et tissulaire lors de l'IC.	81
Figure 42. Représentation de la paroi antérieure du VD issue d'un coeur de patient autopsié atteint de la TOF. ...	83
Figure 43. Forme classique de la TOF.	84
Figure 44. Mise en place du septum inter-ventriculaire et septation du conus dans un coeur humain sain.	86
Figure 45. Cellules progénitrices cardiaques dans la TOF.	88
Figure 46. Approches chirurgicales.	92
Figure 47. Isthmes dans la tétralogie de Fallot.	96
Figure 48. Représentation schématique de la création du modèle rTOF.	108

Figure 49. Enregistrement de Potentiel d'Action Monophasique.	110
Figure 50. Analyse de Potentiel d'Action Monophasique.	111
Figure 51. Représentation schématique des différentes préparations ventriculaires.	112
Figure 52. Préparation RVOT-VD.	114
Figure 53. Sonde sensible au potentiel de membrane.	118
Figure 54. Représentation schématique de la cartographie optique.	120
Figure 55. Photographies du dispositif de cartographie optique utilisé en laboratoire.	120
Figure 56. Sites de stimulation et d'enregistrement des potentiels d'action optiques en fonction du type de tissu cardiaque.	121
Figure 57. Représentation schématique du système de perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff utilisé pour l'isolation des cardiomyocytes ventriculaires.	123
Figure 58. Structure et propriétés de la sonde Fura-2.	126
Figure 59. Dispositif expérimental pour la mesure de la fluorescence du Fura-2 et de la contraction cellulaire.	127
Figure 60. Analyse des paramètres contractiles et des transitoires calciques.	129
Figure 61. Représentation schématique de l'orientation des blocs de tissu lors de l'inclusion.	131
Figure 62. Principe de l'immunomarquage indirect.	133
Figure 63. Principe de l'immunomarquage indirect amplifié par la streptavidine-biotine. ..	133
Figure 64. Représentation schématique du microscope à fluorescence.	139
Figure 65. Représentation schématique du microscope confocal.	140
Figure 66. Analyse de la densité du réseau de tubules T.	142
Figure 67. Représentation schématique de la méthode de dosage BCA colorimétrique.	143
Figure 68. Potentiels d'action monophasiques sur coeur de cochon sain en rythme sinusal.	151
Figure 69. APD ₈₀ mesuré sur coeur entier de cochon en rythme sinusal.	152
Figure 70. APD ₂₀ et APD ₈₀ mesurés sur préparation ventriculaire RVOT-VD.	153
Figure 71. Stimulation du RVOT ENDO : Courbes de restitution dynamique sub-épicaudique et sub-endocardique des APD ₂₀ et des APD ₈₀ de la paroi libre du VD et du RVOT.	155

Figure 72. Stimulation de la paroi libre du VD ENDO : Courbes de restitution dynamique sub-épicaudique et sub-endocardique des APD ₂₀ et des APD ₈₀ de la paroi libre du VD et du RVOT.	157
Figure 73. Expression des ARNm des canaux potassiques cardiaques au sein du VD.	158
Figure 74. Gradient transmural.	158
Figure 75. Carte d'activation sub-épicaudique et sub-endocardique du VD.	159
Figure 76. Vitesses de conduction du VD à 1 Hz.	160
Figure 77. Courbe de restitution des vitesses de conduction au sein du VD.	161
Figure 78. Expression des ARNm de Na _v 1.5 et de la Cx43 au sein du VD.	161
Figure 79. Immunomarquages de la Cx43 et de la N-cadhérine.	162
Figure 80. Fibrose.	164
Figure 81. Adipose focale.	165
Figure 82. Adipose focale sur coeur humain.	166
Figure 83. Orientation des fibres myocardiques.	167
Figure 84. Morphologie cellulaire.	168
Figure 85. Organisation du réseau de tubules T.	169
Figure 86. Paramètres contractiles des cardiomyocytes isolés de la paroi libre du VD et du RVOT.	170
Figure 87. Paramètres des transitoires Ca ²⁺ des cardiomyocytes isolés de la paroi libre du VD et du RVOT.	171
Figure 88. Hétérogénéité et gradients inter-ventriculaires de l'APD ₈₀ dans les coeurs de cochons sham et rTOF.	238
Figure 89. Immunomarquage de la protéine K _v 4.3 et APD ₂₀ sub-endocardique.	240
Figure 90. Immunomarquages de la Cx43 et de la N-cadhérine.	241
Figure 91. Organisation du réseau de tubules T dans les cardiomyocytes.	242

LISTES DES TABLEAUX

Tableau 1. Composition ionique du milieu intra- et extracellulaire d'un cardiomyocyte.	28
Tableau 2. Caractéristiques des principaux canaux ioniques participant au PA des myocytes ventriculaires.	32
Tableau 3. Liste non exhaustive de sondes potentiométriques dérivées du styrylpyridinium.	116
Tableau 4. Tableau synthétisant le protocole utilisé pour la procédure de coloration au teinturier HMS70.	132
Tableau 5. Liste d'anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sur cardiomyocytes ventriculaires et sur coupes tissulaires de ventricule.	134
Tableau 6. Liste des fluorophores utilisés.	134
Tableau 7. Liste des fluorophores utilisés.	135
Tableau 8. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le Western-Blot.	144

LISTES DES ABRÉVIATIONS

AC I : Anticorps primaire
AC II : Anticorps secondaire
Ag : Chlorure d'argent
AM : Groupement acetoxymethylester
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
AP : Artère pulmonaire
APD : Durée de potentiel d'action (*Action potential duration*)
APD₂₀ : Durée de potentiel d'action à 20% de repolarisation
APD₈₀ : Durée de potentiel d'action à 80% de repolarisation
BAPTA : Acide bis-O-aminophénoxy-éthane-N, N, N', N'-tétraacétique
BBD : Bloc de branche droit
BBG : Bloc de branche gauche
BCA : Acide bicinchoninic
BCL : Durée du cycle cardiaque (*Basic cycle length*)
BSA : Surface corporelle (*Body surface area*)
BU : Bloc unidirectionnel
Ca²⁺ : Ion calcium
CaM : Calmoduline
CamKII : Protéine kinase II dépendante de la calmoduline
CEC : Couplage excitation-contraction
CICR : Libération du calcium induite par le calcium (*Calcium induced calcium release*)
CIV : Communication inter-ventriculaire
Cl⁻ : Ion chlore
CMLs : Cellules musculaires lisses
CO₂ : Dioxyde de carbone
Cxs : Connexines
DAD : Post-dépolarisation tardive (*Delayed afterdepolarization*)
DAVD : Dysplasie arythmogène du ventricule droit
DHPRs : Récepteurs à la dihydropyridine
DI : Intervalle diastolique (*Diastolic interval*)
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
EAD : Post-dépolarisation précoce (*Early afterdepolarization*)
ECG : Electrocardiogramme
EGTA : Acide ethylene diamine tétraacétique
E_m : Potentiel de membrane
ENDO : Couche sub-endocardique
EPI : Couche sub-epicardique
ESV : Extrasystole ventriculaire
ETOH : Ethanol
F : Fluorescence

ΔF : Variation de fluorescence
FA : Fibrillation atriale
FFT : Transformée de Fourier rapide
FV : Fibrillation ventriculaire
HEPES : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-piperazine ethane sulfonique
 I_{Ca} : Courant calcique de type L
IC : Insuffisance cardiaque
ICD : Insuffisance cardiaque droite
ICG : Insuffisance cardiaque gauche
 I_f : Courant pacemaker ou funny
 I_K : Courant potassique
 I_{K1} : Courant potassique rectifiant entrant
 I_{Kr} : Courant potassique retardé composante rapide
 I_{Ks} : Courant potassique retardé composante lente
 I_{Na} : Courant sodique
 $I_{Na/K}$: Courant Na^+/K^+
 $I_{Na\ late}$: Courant sodique à inactivation lente
 I_{NCX} : Courant Na^+/Ca^{2+}
IRM : Imagerie par résonance magnétique
 I_{to} : Courant transitoire potassique sortant
 $I_{to,f}$: Courant transitoire potassique sortant composante rapide
 $I_{to,s}$: Courant transitoire potassique sortant composante lente
IVA : Artère inter-ventriculaire antérieure
IVP : Insuffisance valvulaire pulmonaire
 K^+ : Ion potassium
Kd : Constante de dissociation
LS : Longueur sarcomère
MAP : Potentiel d'action monophasique (*Monophasic action potential*)
MAPD : Durée du potentiel d'action monophasique (*Monophasic action potential duration*)
MAPD₂₀ : Durée du potentiel d'action monophasique à 20% de repolarisation
MAPD₈₀ : Durée du potentiel d'action monophasique à 80% de repolarisation
MB : Bandelette modératrice (*Moderator band*)
MCU : Uniporteur calcique mitochondrial (*Mitochondrial calcium uniporter*)
MEC : Matrice extracellulaire
MHC : Chaîne lourde de myosine (*Muscle heavy chain*)
MLC-1 : Chaîne légère de myosine essentielle (*Muscle light chain-1*)
MLC-2 : Chaîne légère de myosine régulatrice (*Muscle light chain-2*)
MMP : Métalloprotéinases
MyBP-C : Protéine C liant la myosine (*Cardiac myosin-binding protein*)
 Na^+ : Ion sodium
 Na^+/K^+ : Pompe sodium-potassium
NAV : Nœud Auriculo-Ventriculaire
NCX : Échangeur sodium-calcium
NSA : Nœud Sino-atrial

O₂ : Dioxygène
OD : Oreillette droite
OG : Oreillette gauche
ORO : Huile rouge (*Red oil*)
PA : Potentiel d'Action
PBS : Tampon phosphate salin (*Phosphate-buffered saline*)
PFA : Paraformaldéhyde
PKA : Protéine Kinase A
PLB : Phospholamban
PMCA : Pompe membranaire calcique ATPase (*Plasma membrane Ca²⁺ ATPase*)
PMT : Photomultiplicateur
PP1 : Phosphatase 1
PP2A : Phosphatase 2A
PRT : Période réfractaire
PRA : Période réfractaire absolue
PRE : Période réfractaire effective
PRR : Période réfractaire relative
RI : Index de régularité (*Regularity index*)
RP : Régurgitation pulmonaire
RS : Réticulum sarcoplasmique
rTOF : Tétralogie de Fallot réparée
RVOT : Infundibulum pulmonaire (*Right ventricular outflow tract*)
RyRs : Récepteurs à la ryanodine (*Ryanodine receptor*)
SERCA : Pompe Ca²⁺ ATPasique du réticulum sarcoplasmique (*Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase*)
SMT : Bandelette septomarginale (*Septomarginale trabéculatation*)
TAE : Tissu adipeux épicardique
Tau : Constante de temps
TAVP : Tissu adipeux péri-vasculaire
TG : Triglycérides
TnC : Troponine C
TnI : Troponine I
TnT : Troponine T
TOF : Tétralogie de Fallot
Tubules T : Tubules transverses
TV : Tachycardie ventriculaire
TVI : Tachycardie ventriculaire idiopathique
UVs : Ultraviolets
VC : Vitesse de conduction
VD : Ventricule droit
VG : Ventricule gauche
V_L : Vitesse de conduction longitudinale
V_T : Vitesse de conduction transverse

RÉSUMÉ

Mécanismes arythmogènes dans le ventricule droit sain et dans la dysfonction ventriculaire droite.

Résumé : Le ventricule droit (VD) possède une embryogénèse, une géométrie et des propriétés biomécaniques différentes du ventricule gauche (VG). L'infundibulum pulmonaire (RVOT) est une origine fréquente d'arythmies dans le VD sain ou pathologique. La tétralogie de Fallot (TOF) est la cardiopathie congénitale cyanogène la plus fréquente et est associée à une dysfonction du VD. Si la correction chirurgicale a augmenté l'espérance de vie des patients TOF, à l'âge adulte les séquelles chirurgicales du VD et RVOT conduisent souvent à une insuffisance cardiaque, des arythmies voire la mort subite cardiaque.

Les objectifs de cette thèse sont de : (i) définir les propriétés électrophysiologiques et structurales du VD sain chez le cochon et (ii) caractériser le remodelage arythmogène des ventricules dans un modèle porcin de réparation de TOF (rTOF).

Nous avons démontré la présence d'une hétérogénéité de repolarisation et de conduction dans le VD sain en lien avec un profil d'expression spécifique des canaux ioniques dans le RVOT sub-épicaire. Une approche histologique a également permis de mettre en évidence une structure tissulaire spécifique au RVOT contribuant au ralentissement de l'activation de cette région. Les cœurs des cochons rTOF témoignent d'un remodelage électrophysiologique et structural pro-arythmique du VD caractérisé par une dispersion de la repolarisation, et un ralentissement de la conduction corrélé à un remodelage moléculaire et structural. Nous décrivons également la présence d'un remodelage arythmogène distinct dans le VG rTOF sur le plan électrique et structural sans modification des propriétés hémodynamiques.

En conclusion, ces travaux révèlent la présence de substrats arythmogènes du VD sain et un profond remodelage pro-arythmique dans les ventricules rTOF.

Mots clés : infundibulum pulmonaire, tétralogie de Fallot, mort subite

Arrhythmic mechanisms in the healthy right ventricle and in RV dysfunction.

Abstract: The right ventricle (RV) has different embryologic history, geometry and biomechanics properties compared to the left ventricle (LV). The right ventricular outflow tract (RVOT) is a common arrhythmia origin in the healthy or pathological RV. Tetralogy of Fallot (TOF) is the most frequent cyanotic congenital heart disease and is associated with RV dysfunction. Surgical correction has significantly increased patient's life expectancy but surgical lesions often lead to heart failure, arrhythmias even sudden cardiac death in adulthood.

The aims of this work are to: (i) define RVOT electrophysiological and structural properties in the healthy pig and (ii) characterize a potential arrhythmogenic remodeling in both ventricles in a porcine model mimicking repaired TOF (rTOF).

We showed the presence of repolarization and conduction heterogeneities in the healthy RV in relation to a specific ion channel expression profile in the RVOT epicardium. Moreover, an histological approach highlighted the presence of a specific tissue structure likely to contribute to the slow conduction observed in this region. A pro-arrhythmic electrophysiological and structural remodeling was found in the RV of rTOF pigs. This remodeling was characterized by an increased dispersion of repolarization and slower conduction properties which were linked to a molecular and structural remodeling. Interestingly, we also described a distinct electrical and structural arrhythmogenic remodeling in the rTOF LV in the absence of hemodynamic alteration.

To conclude, this work revealed the presence of an arrhythmogenic substrate within the healthy RV and a profound arrhythmogenic remodeling of both ventricles in rTOF.

Keywords: pulmonary infundibulum, tetralogy of Fallot, sudden cardiac death

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I/ Généralités sur le cœur : de l'anatomie à la fonction

1. Le cœur dans son anatomie et sa structure

Le cœur est un muscle strié reposant sur le diaphragme, près du centre de la cage thoracique dans un espace appelé le médiastin qui s'étend du sternum à la colonne vertébrale, entre les poumons. Il est responsable de la circulation sanguine de l'ensemble de l'organisme.

a) Embryologie du cœur

Chez les vertébrés, le cœur représente le premier organe fonctionnel de l'embryon (*Perez-Pomares et al., 2009*). La formation du cœur résulte d'une morphogénèse complexe dans le temps et l'espace sous la dépendance d'un programme génétique.

Chez l'homme, elle commence au début du 15^{ème} jour de vie intra-utérine par la formation du tube cardiaque primitif et se termine entre les 50-60^{èmes} jours de vie intra-utérine avec la connexion des artères coronaires à l'aorte.

Le cœur a pour origine le mésoderme splanchnique antérieur situé entre le feuillet embryonnaire ventral appelé endoderme et le feuillet dorsal, l'ectoderme. Les cellules du mésoderme se regroupent en îlot de cellules angioformatrices (*Fishman and Chien, 1997*) qui trouvent leur origine de chaque côté de la ligne primitive de l'embryon. Ces îlots cellulaires migrent vers la partie encéphalique de l'embryon et se rejoignent à l'avant de la plaque neurale pour former un plexus vasculaire en forme de croissant : la plaque cardiogénique (**Figure 1A**).

La plaque cardiogénique se divise en deux couches : ventrale et dorsale. La majeure partie de la couche ventrale sera à l'origine du myocarde alors que la couche dorsale donnera le péricarde.

Au 18^{ème} jour de vie intra-utérine, l'ébauche cardiaque sous forme de deux plaques latérales s'invagine pour former les tubes cardiaques primitifs, repoussés en position thoracique de l'embryon.

A partir du 22^{ème} jour de vie intra-utérine en faveur de l'inflexion transversale de l'embryon, les tubes cardiaques primitifs formés à partir de la plaque cardiogénique vont se

INTRODUCTION

rapprocher et fusionner formant ainsi le tube cardiaque primitif. La fusion des tubes cardiaques primitifs est sous la dépendance du facteur de transcription GATA4 (*GATA4 binding protein*) lui-même sous la dépendance du gène *ZFPM2* (*Zinc finger protein, FOG family member 2*) (Kuo et al., 1997). Des études ont montré que l'inactivation du gène *GATA4* chez la souris entraînait une absence de fusion des tubes cardiaques primitifs accompagnée d'une mort précoce de l'embryon (Molkentin et al., 1997).

Ce tube cardiaque primitif est composé de cellules épithéliales recouvertes de mésoblaste à l'origine des cardiomyocytes et des cellules endocardiques qui tapissent la lumière du tube cardiaque en réponse à des signaux d'induction tels que le BMP (*Bone Morphogenic Protein*) provenant de l'endoderme.

Il est de forme rectiligne et se compose de différents segments connectés entre eux (**Figure 1B**) :

- Pôle artériel antérieur ou troncus
- Conus ou bulbe artériel séparé du ventricule primitif par un sillon cono-ventriculaire
- Ventricule primitif séparé de l'oreillette primitive par le sillon atrio-ventriculaire
- Oreillette primitive
- Pôle veineux postérieur

Les premières contractions cardiaques apparaissent à partir du 22^{ème} jour de développement embryonnaire.

Des études ont montré que le cœur avait pour origine deux populations de cellules progénitrices dès le stade de plaque cardiogénique (Kelly et al., 2001) (**Figure 1A**).

On retrouve les cellules du premier champ cardiaque à l'origine du tube cardiaque linéaire et du ventricule gauche (VG) ainsi que la partie antérieure des oreillettes ; et les cellules du second champ cardiaque responsables du développement du ventricule droit (VD) et des pôles artériels et veineux du cœur. De façon plus détaillée, les cellules du second champ cardiaque se divisent en deux populations cellulaires (**Figure 1B**) :

- Le mésocarde dorsal à l'origine du pôle veineux, assurant la formation des oreillettes, des veines pulmonaires, et de la septation atrio-ventriculaire
- L'aire cardiaque antérieure à l'origine du pôle artériel, assurant la formation du VD et des voies d'éjection (aorte et artère pulmonaire)

Durant le 23^{ème} jour de vie intra-utérine, le tube cardiaque primitif s'allonge par ses pôles grâce à l'ajout de cellules du second champ cardiaque (Kelly and Buckingham, 2002). Le tube est composé d'une partie antérieure (aire cardiaque antérieure) et d'une partie

postérieure (mésocarde dorsal) puis se courbe pour former une boucle à convexité droite (« D looping ») avec les ventricules en avant et les oreillettes en arrière (**Figure 1C et Figure 2**). Cette étape permet une latéralisation droite-gauche du cœur embryonnaire. Le gène *NKX2.5* (*NK2 transcription factor related locus 5*) joue un rôle essentiel dans la formation de la boucle cardiaque (loop). Une inactivation de ce gène chez la souris entraîne une mauvaise formation de la boucle cardiaque et la mort des embryons (*Lyons et al., 1995*).

Entre le 40^{ème} et 42^{ème} jour, la convergence des voies d'admission et d'éjection est nécessaire afin d'assurer la septation ventriculaire ainsi qu'un alignement correct des cavités cardiaques. Durant cette période, on observe une croissance des ventricules due à la prolifération des cardiomyocytes ainsi que l'apparition des trabécules au niveau de l'endocarde.

Le cœur comporte ainsi cinq segments : l'oreillette droite (OD) primitive, l'oreillette gauche (OG) primitive, le ventricule droit (VD) primitif, le ventricule gauche (VG) primitif et le cono-troncus (**Figure 1C**). Le cono-troncus, situé à l'extrémité supérieure du bulbe du cœur est composé de deux segments myocardique : le conus et le troncus. Le conus correspond à la région du cœur en forme de cône faisant suite à la partie distale du ventricule primitif et la relie au troncus. Le conus a en charge la répartition des entrées et des sorties ventriculaires et donnera l'infundibulum pulmonaire (RVOT, *Right ventricular outflow tract*). Il est à l'origine de la formation du septum conal ou infundibulaire qui participe à la formation du septum ventriculaire dans sa partie antérieure haute (*Restivo et al., 2006*). Initialement le conus est surplombé par le troncus, à l'origine du tronc artériel, dont la partie droite rattachée aux 3^{ème} et 4^{ème} arcs branchiaux donnera l'aorte, et la partie gauche rattachée au 6^{ème} arc donnera l'artère pulmonaire (AP). Le troncus se différenciera en valves semi-lunaires.

Les quatre cavités cardiaques présentent un profil d'expression génétique qui leur est propre, assurant ainsi le bon développement de ces dernières. En effet, on retrouve majoritairement le facteur de transcription *Hand2* (*Heart autonomous nervous system neural crest derivatives*) au niveau du VD et le facteur de transcription *Hand1* au niveau du VG (*Srivastava et al., 1995; Vincentz et al., 2011*). Ces deux facteurs de transcription sont codés par les gènes *HAND* qui sont également exprimés dans les voies efférentes (voies d'éjection) des ventricules. Chez la souris une surexpression du gène *HAND1* provoque une hypertrophie du VG (*Risebro et al., 2006*). Une inactivation du gène *HAND2* provoque une altération de la morphogénèse du VD alors même que le tissu cardiaque est correctement différencié (*Srivastava et al., 1997*).

INTRODUCTION

Le développement du coeur se poursuit par un remaniement des cavités primitives grâce à l'apparition d'un cloisonnement par la formation de septas et de valves.

Le gène *TBX1* (*T-box transcription factor 1*) codant pour un activateur de transcription, joue un rôle essentiel dans la formation du septum conal (partie du septum inter-ventriculaire situé entre les valvules aortiques et pulmonaires) (Parisot *et al.*, 2011). Ce gène est exprimé dans l'endoderme, les cellules précurseurs des voies efférentes et dans les cellules du deuxième champ cardiaque. Il contrôle la prolifération et la différenciation des cellules du second champ cardiaque. Chez la souris, son inactivation est à l'origine de malformations cardiaques cono-troncales (Lindsay *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2004) (cf. Section Aspects génétiques de la maladie de la tétralogie de Fallot). Une mutation du gène *TBX1* chez l'homme provoque le syndrome de Di George (ou syndrome 22q11.2) une cardiopathie congénitale de type cono-troncal observée chez 15% des patients atteints de tétralogie de Fallot (Momma, 2010).

A partir du 50^{ème} jour de vie intra-utérine, plusieurs cloisonnements s'effectuent lors du développement de l'embryon : les cloisonnements inter-atrial, auriculo-ventriculaire, et inter-ventriculaire.

Deux autres types cellulaires participent également à la formation du cœur définitif (**Figure 1D**), les cellules de la crête neurale et les cellules de l'épicarde. Les cellules de la crête neurale migrent à partir du tube neural et colonisent le tube cardiaque, elles sont responsables de la mise en place des voies d'éjection et de l'arc aortique (Farrell *et al.*, 1999). Elles sont localisées au niveau du tronc cono-troncal et transitent dans les arcs branchiaux expliquant ainsi l'association malformative fréquente entre les dérivés d'arcs branchiaux et les dérivés pulmonaires. Les cellules de l'épicarde issues du mésoderme splanchnique contribuent à la mise en place des artères coronaires et des valvules atrio-ventriculaires.

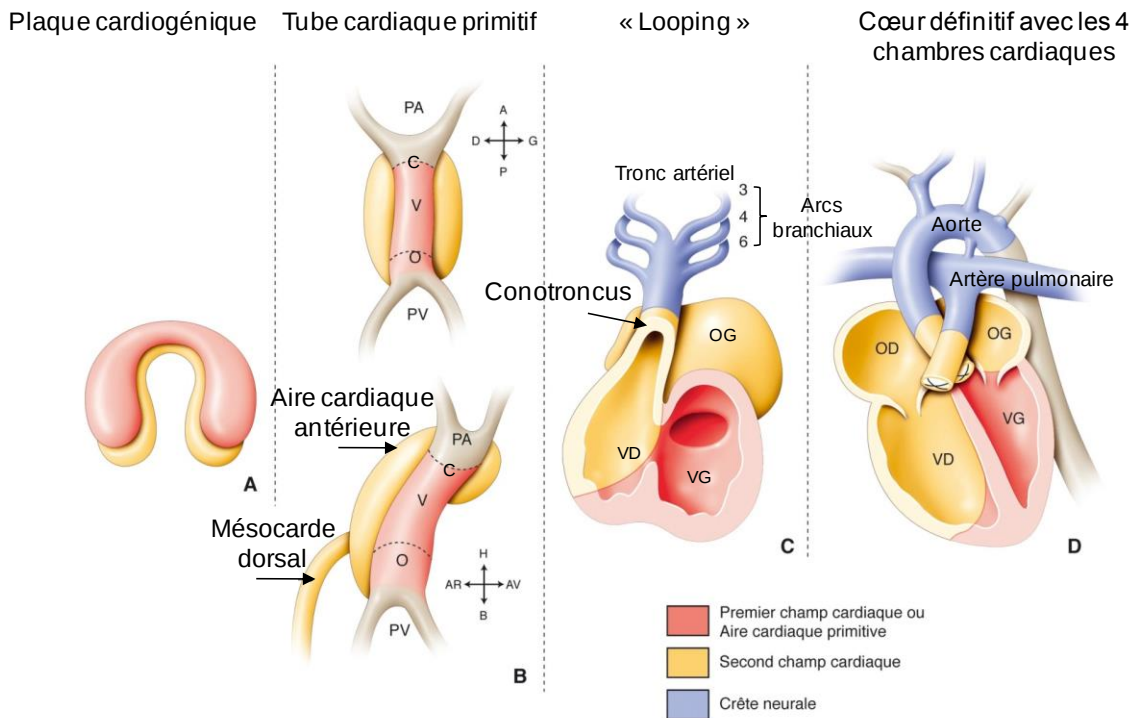


Figure 1. Etape du développement embryonnaire cardiaque chez l'Homme. Stade plaque cardiogénique avec les cellules du premier et du second champ cardiaque (A). Formation du tube cardiaque primitif avec les cinq compartiments PA (pôle artériel ou troncus), C (conus ou bulbe artériel), V (ventricule primitif), O (oreillette primitive) et PV (pôle veineux), et la différenciation des cellules du second champ cardiaque en aire cardiaque antérieure et en mésocarde dorsal (B). Formation de la boucle à convexité droite avec les ventricules en avant et les oreillettes en arrière (C). Cœur définitif avec les quatre chambres cardiaques OD (oreillette droite), OG (oreillette gauche), VD (ventricule droit) et VG (ventricule gauche) (D). A (antérieur), AR (arrière), AV (avant), B (bas), D (droite), G (gauche), H (haut), P (postérieur). Adapté du site internet <http://hebee.fr/fr/embryology>.

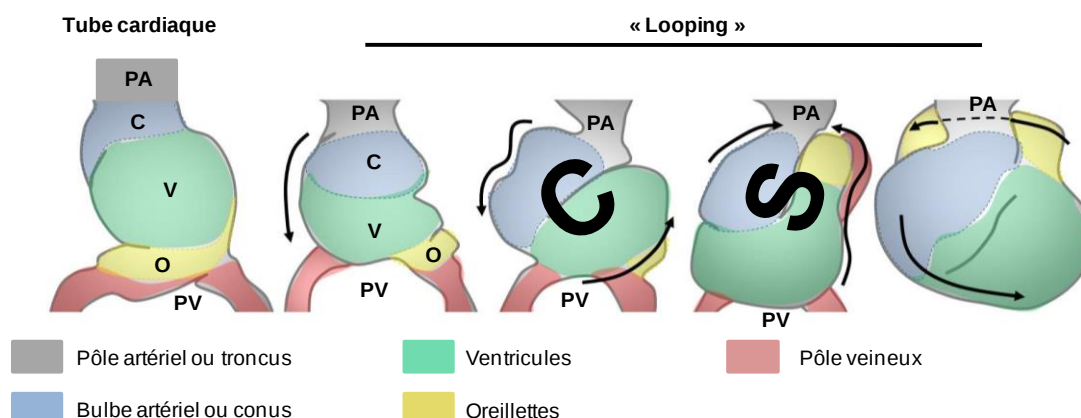


Figure 2. Formation de la boucle cardiaque « Looping ». La boucle (loop) cardiaque est un phénomène par lequel le tube cardiaque rectiligne et symétrique en extérieur se transforme en structure asymétrique gauche-droite au 23^{ème} jour de vie embryonnaire. La formation de la boucle résulte à la fois d'un mouvement d'incurvation et de rotation. Le tube cardiaque s'infléchit selon une courbure à convexité droite (D-loop) initialement en forme de C, puis en forme de S après la rupture du mésocarde dorsal amenant ainsi le futur VD en position ventrale et droite et le futur VG en position dorsale et gauche. Adapté du site internet <http://embryology.med.unsw.edu.au>.

INTRODUCTION

b) Anatomie du cœur

Le cœur est un organe musculaire de forme conique et pèse chez l'homme adulte environ 300 g. Il est constitué de quatre cavités : les deux oreillettes, droite et gauche, dans la partie supérieure et les deux ventricules, droit et gauche, dans la partie inférieure. Le bord supérieur du cœur correspond à la base, et la pointe du cœur formée par l'extrémité du VG est appelée l'apex. Les deux ventricules sont séparés par le septum inter-ventriculaire, et les deux oreillettes par le septum inter-auriculaire (**Figure 3**).

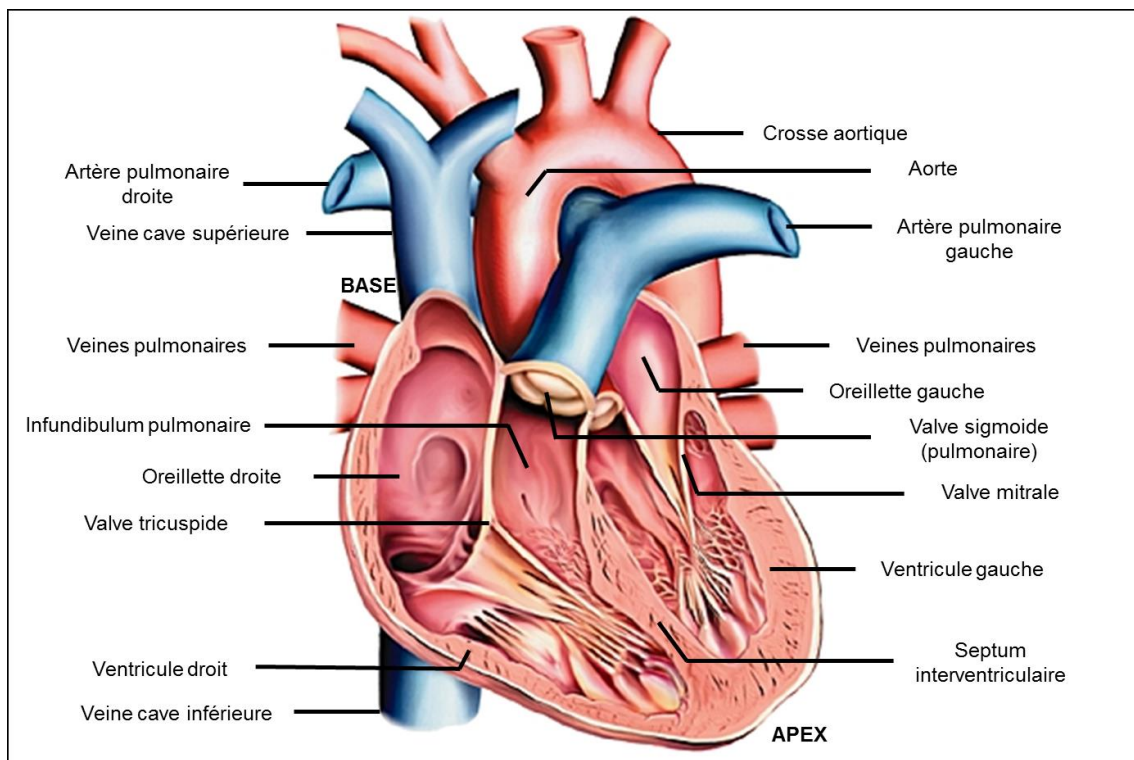


Figure 3. Anatomie de la face antérieure du cœur en coupe transversale. Le cœur se divise en quatre chambres cardiaques : deux oreillettes et deux ventricules séparés par le septum. Le VG éjecte le sang vers l'aorte afin d'assurer la perfusion sanguine de l'organisme. Le VD expulse le sang via l'AP vers les poumons. Adapté du site internet <http://www.larousse.fr/encyclopedie>.

Le cœur est composé de deux pompes juxtaposées et synchronisées : le « cœur droit » et le « cœur gauche ». L'OD et le VD constituent le « cœur droit » alors que l'OG et le VG composent le « cœur gauche ». Pour chaque demi cœur, l'oreillette est séparée du ventricule par des valvules auriculo-ventriculaires assurant un sens unique à la circulation sanguine. La valvule du « cœur droit » est appelée valvule tricuspide, formée de trois feuillets fixés sur un anneau fibreux séparé par trois commissures : antéro-septale, antéro-postérieure, et postéro-septale. La valvule du « cœur gauche » correspond à la valvule mitrale. Il s'agit d'un

repli membraneux composé de deux valves cuspides, l'une septale (antérieure) et l'autre pariétale (postérieure).

Le cœur présente également des valvules artérielles à la sortie de chaque ventricule composées de trois valves sigmoïdes. La valvule aortique se situe entre le VG et l'aorte et la valvule pulmonaire entre le VD et l'AP.

c) La paroi cardiaque

La paroi cardiaque est constituée de trois tuniques composées de l'extérieur vers l'intérieur du péricarde, du myocarde et de l'endocarde (**Figure 4**).

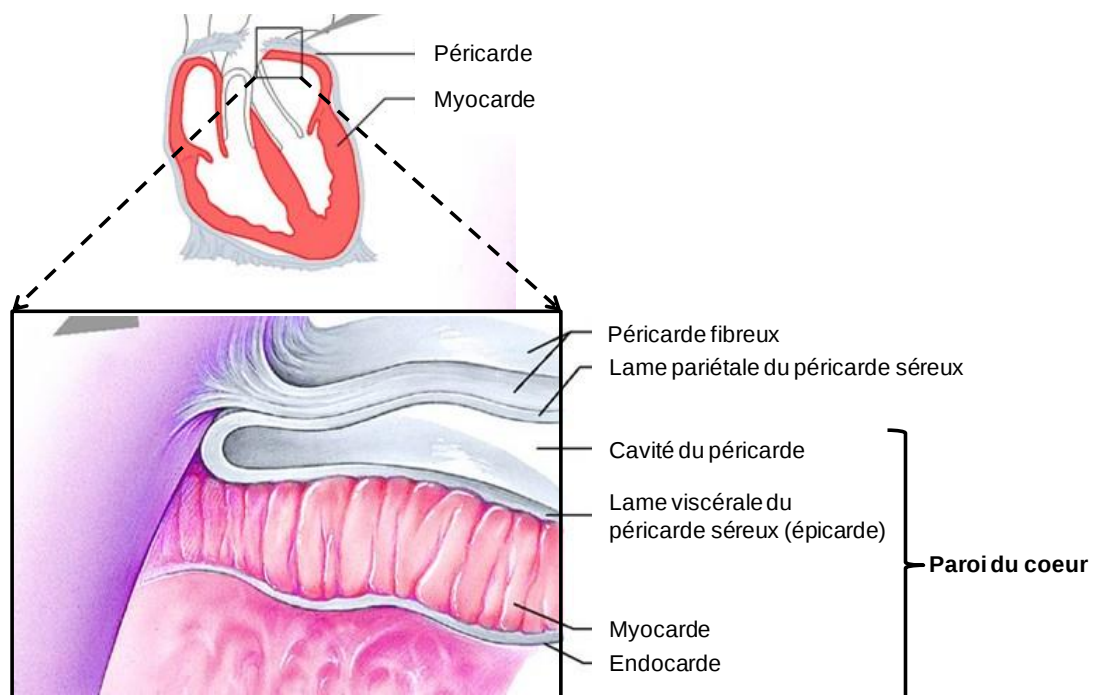


Figure 4. Structure de la paroi cardiaque. La paroi cardiaque est composée de trois tuniques : le péricarde, le myocarde, l'endocarde. *Adapté de (Marieb, 1999).*

Le péricarde est une double enveloppe qui entoure le cœur et l'isole du reste de la cage thoracique. Il soutient le cœur dans le thorax et permet de limiter la dilatation du cœur. Il est composé de deux feuillets, un feuillet externe et interne. Le feuillet externe de nature fibreuse se prénomme le péricarde fibreux. Il est bordé à sa face interne par une séreuse, on parle de péricarde séreux. Le feuillet interne correspond au péricarde viscéral appelé encore épicarde. Il s'agit d'une seconde couche séreuse qui constitue la paroi cardiaque. Il est composé de cellules mésothéliales, de tissu conjonctif, de fibroblastes et d'adipocytes. Entre les feuillets externe et interne, on retrouve la cavité péricardique qui contient un liquide séreux environ 15 à 60 mL, sécrété par les cellules mésothéliales des deux feuillets. Ce liquide

INTRODUCTION

séreux permet de lubrifier et de diminuer les forces de frottement lors de la contraction cardiaque.

Le myocarde constitue le tissu contractile formant la majeure partie du cœur. Il est composé de cellules musculaires striées organisées en faisceau où les jonctions intercellulaires forment des disques intercalaires. Entre ces faisceaux, l'environnement conjonctif est riche en vaisseaux et en fibres nerveuses sensibles. Son épaisseur est liée à sa fonction, fine au niveau des oreillettes et plus épaisse au niveau des ventricules notamment pour le VG (*Lorenz et al., 1999*).

L'endocarde est un épithélium tapissant la face interne des quatre cavités cardiaques et se prolonge dans la tunique interne des artères et des veines. Il repose sur une couche de tissu conjonctif formée de fibroblastes, de collagène, de fibres nerveuses et élastiques. Il permet de faciliter la circulation sanguine et d'empêcher la coagulation. Au niveau des ventricules, des fibres de Purkinje tapissent la surface endocardique et pénètrent dans le myocarde selon les espèces.

d) Morphologie des cavités cardiaques : les ventricules

Les ventricules possèdent des caractéristiques embryologiques, génétiques, anatomiques, physiologiques et fonctionnelles différentes.

D'un point de vue macroscopique, la morphologie du VD est complexe, et influencée par la position du septum inter-ventriculaire. En section coronale, le VD est de forme triangulaire alors que le VG est de forme elliptique. En section axiale, le VD possède une forme de croissant et le VG une forme circulaire. Après dissection, le VD se compose de trois chambres : une chambre d'admission ou sinus comprenant la valvule tricuspide, le cordage tendineux, et les muscles papillaires ; une chambre trabéculaire située à l'apex du VD et une chambre de chasse appelée infundibulum pulmonaire ou RVOT (**Figure 5**). Au sein de la cavité du VD, on peut noter la présence de trois bandelettes musculaires : la bandelette septomarginale (SMT, *Septomarginal trabeculation*), la bandelette pariétale (ou éperon de Wolff) et la bandelette modératrice (MB, *Moderator band*) (*Ho and Nihoyannopoulos, 2006*). La bande pariétale délimite avec le septum conal, la crista supraventricularis, alors que la SMT s'étend en position inférieure et se poursuit avec la MB.

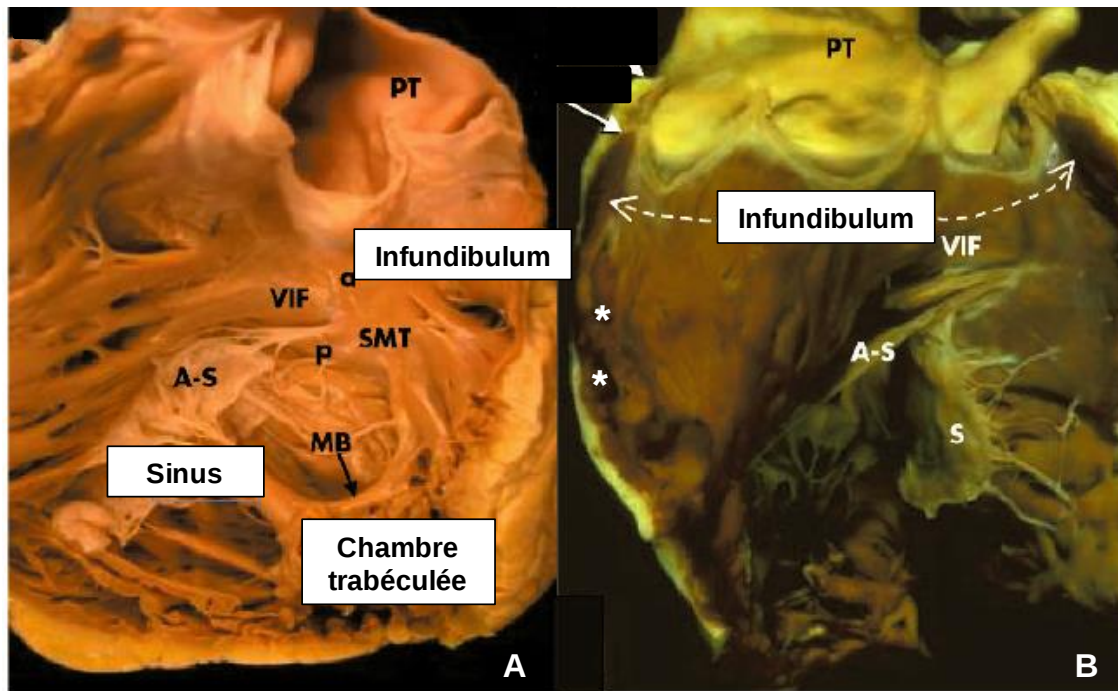


Figure 5. Aspect morphologique de la cavité du ventricule droit. Coupe septale du VD mettant en évidence les trois chambres : le sinus, la chambre trabéculée et l'infundibulum **(A)**. On note la présence de la bandelette septomarginale (SMT) avec sa partie antérieure (a) et postérieure (p). Le pli ventriculo-infundibulaire sépare la valvule tricuspide de la valvule pulmonaire (VIF). La dissection de l'infundibulum **(B)** au niveau du tronc de l'artère pulmonaire (PT) montre la valve antéro-supérieure (A-S) ainsi que la valve postéro-septale (S) de la valvule tricuspide. Des trabécules septopariétales peuvent être observées (*). *Adapté de (Ho and Nihoyannopoulos, 2006).*

Le VG s'étend en avant et à gauche jusqu'à l'apex du cœur. Il se compose de deux parois, un sommet et une base. La première paroi gauche ou latérale est dite « libre », la seconde paroi interne (septale) répond au septum inter-ventriculaire. Le sommet du VG est arrondi et présente une surface intérieure couverte de trabécules charnues proéminentes et des muscles papillaires antérieurs et postérieurs **(Figure 6A et 6B)**. Il est occupé par la valvule mitrale dont les deux valves sont maintenues par des cordages tendineux issus des muscles papillaires. L'ostium aortique de forme circulaire est occupé par la valvule aortique. La cavité du VG se rétrécit en haut et au dos de l'infundibulum pour constituer un vestibule aortique, correspondant à la partie du ventricule qui communique avec l'aorte ascendante par l'orifice aortique **(Figure 6A)**.

Au sein du VG, deux chambres séparées par un rideau formé des cordages tendineux tendus de l'apex des muscles papillaires à la valve antérieure de la valvule mitrale sont différenciées. Il existe la chambre de chasse à droite qui s'évacue par l'ostium de l'aorte, et la chambre de remplissage à gauche où s'ouvre la valvule mitrale **(Figure 6C)**.

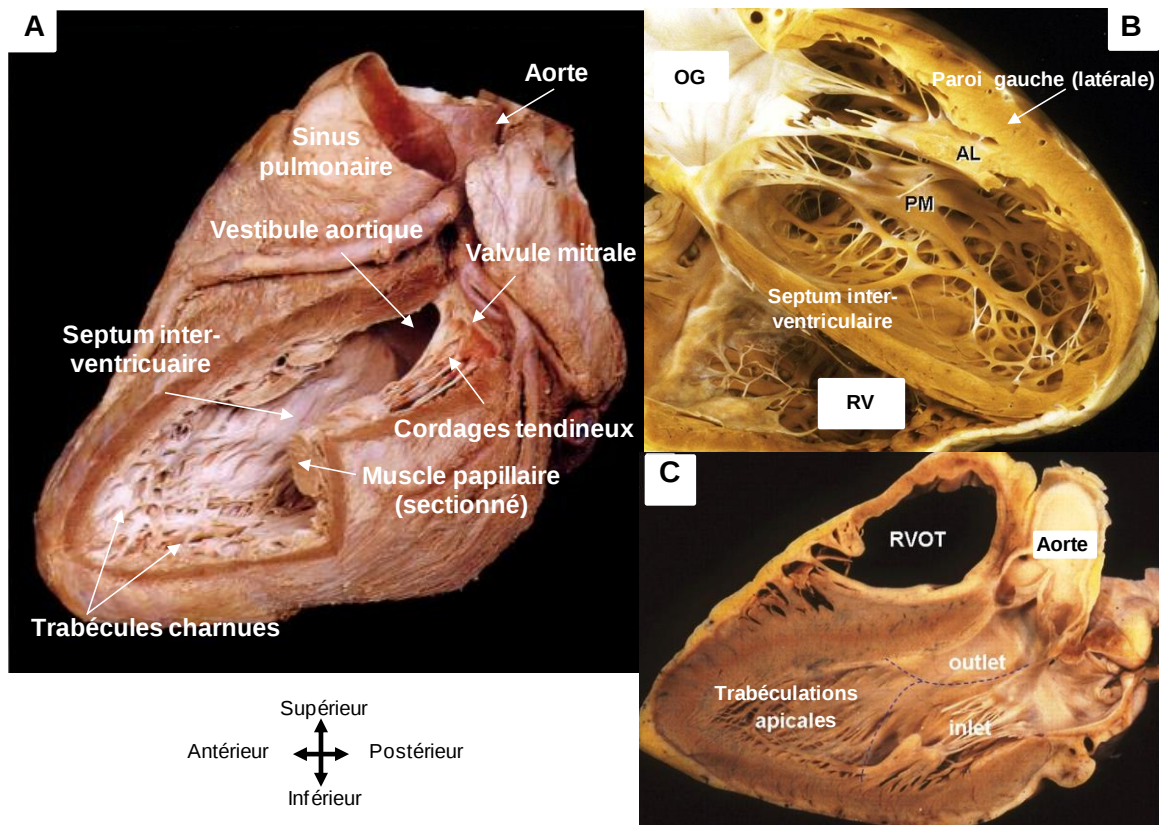


Figure 6. Aspect morphologique de la cavité du ventricule gauche. Coupe sagittale du VG issu d'un cœur humain après résection d'une partie de sa paroi (A). Le VG est doté d'un squelette interne composé de la valvule mitrale, de cordages tendineux, de piliers (muscles papillaires). La chambre d'éjection est bordée d'une paroi (vestibule aortique) qui conduit l'ostium aortique. La section longitudinale d'un VG de cœur humain montre les deux muscles papillaires : le muscle papillaire antéro-latéral (AL) sur la paroi latérale gauche et le muscle papillaire postéro-médian (PM) (B). La paroi est couverte en son sommet d'un réseau de trabécules charnues plus fines et plus nombreuses que le VD. Le VG se divise en deux chambres : la chambre de chasse droite (outlet) et la chambre de remplissage gauche (inlet) (C). Adapté de (Gosling et al., 2002; Ho, 2009).

Durant la période foetale, l'épaisseur de la paroi des ventricules ainsi que la force générée par ces derniers sont similaires. L'explication réside dans le fait que les résistances vasculaires pulmonaires et périphériques sont semblables. Après la naissance, l'AP se dilate et les résistances pulmonaires diminuent favorisant ainsi l'amincissement de la paroi du VD et l'augmentation de sa compliance (Brittain et al., 2012). De ce fait, on estime l'épaisseur du VD entre 2 et 5 mm et celle du VG entre 7 et 11 mm (Haddad et al., 2008b). Chez l'adulte, le volume du VD ($75 \pm 13 \text{ mL/m}^2$) est plus important que celui du VG ($66 \pm 12 \text{ mL/m}^2$) alors que la masse du VD ne représente qu'un sixième de celle du VG (Lorenz et al., 1999).

Sur le plan architectural, le VD possède des fibres myocardiques profondes sous-endocardiques longitudinales orientées de la base vers l'apex et des fibres superficielles sous-épicaudiques plus ou moins circonférentielles en continuité avec celle du VG. Le VG quant à lui, présente des fibres sous-épicaudiques obliques en hélice levogyre ouverte vers la chambre de chasse aortique ; des fibres sous-endocardiques longitudinales et obliques en hélice

dextrogyre, et des fibres moyennes circulaires au centre de la paroi à l'origine de la contraction radiaire de ce dernier. La contraction du VD est séquentielle, elle débute au niveau du sinus et se propage vers l'infundibulum avec un délai de 25-50 ms (*Haddad et al., 2008b*). De manière plus détaillée, la contraction du VD démarre de la valvule tricuspide vers l'apex de la chambre trabéculée, puis de l'apex vers la valvule pulmonaire : la contraction de l'infundibulum est plus longue que celle du sinus. Le raccourcissement des fibres longitudinales le long de l'axe base-apex joue un rôle majeur dans le fonctionnement de la pompe du VD. Les fibres sous-épicaudiques communes aux deux ventricules sont essentielles à l'interdépendance ventriculaire. En effet, la contraction du VG participerait à hauteur de 20 à 40% à la contraction du VD (*Santamore and Dell'Italia, 1998*).

L'infundibulum ou RVOT présente des caractéristiques morphologiques lui conférant des propriétés resistives face à la pression générée par le VD. L'architecture des fibres myocardiques organisée de façon circonférentielle et parallèle les unes aux autres assure une diminution du diamètre de l'infudibulum lors des contractions du VD. Le stress pariétal engendré par l'augmentation du volume du VD lors des contractions est plus faible au niveau de l'infundibulum qu'au niveau du sinus.

La contraction du VG s'effectue selon l'association de quatre mouvements différents : un raccourcissement radiaire (concentrique), un épaississement de la paroi, un raccourcissement longitudinal de la base vers l'apex du VG et une rotation globale anti-horaire (*Spotnitz, 2000*). Les mouvements de raccourcissement radiaire et de rotation sont plus importants dans les parois latérales et antérieures du VG que dans les parois septales, et préférentiellement dans les couches sous-endocardiques plutôt que dans les couches sous-épicaudiques. De plus, la contraction débute dans les fibres sous-endocardiques et à l'apex, puis se propage des couches du sous-endocarde vers les couches du sous-épicaudique et de l'apex vers la base. L'apex reste immobile car c'est la base du VG qui se déplace en direction de l'apex.

2. La composition histologique du tissu musculaire cardiaque : le myocarde

Le myocarde est composé de trois couches de tissus : les couches sub-épicaudiques (EPI) à la surface externe du cœur en contact avec le péricarde, les couches sub-endocardiques (ENDO) sur la surface interne des cavités cardiaques et une couche médiane appelée midmyocarde. Le myocarde est un tissu hétérogène composé de différents types cellulaires : les cellules musculaires et non-musculaires dont la cohésion est assurée par la matrice extracellulaire (MEC) jouant le rôle de charpente (**Figure 7**). Il s'agit d'un tissu

INTRODUCTION

possédant une architecture solide, flexible et résistante aux contraintes mécaniques. L'organisation et la proportion des différents types cellulaires sont donc importantes pour le bon fonctionnement du cœur.

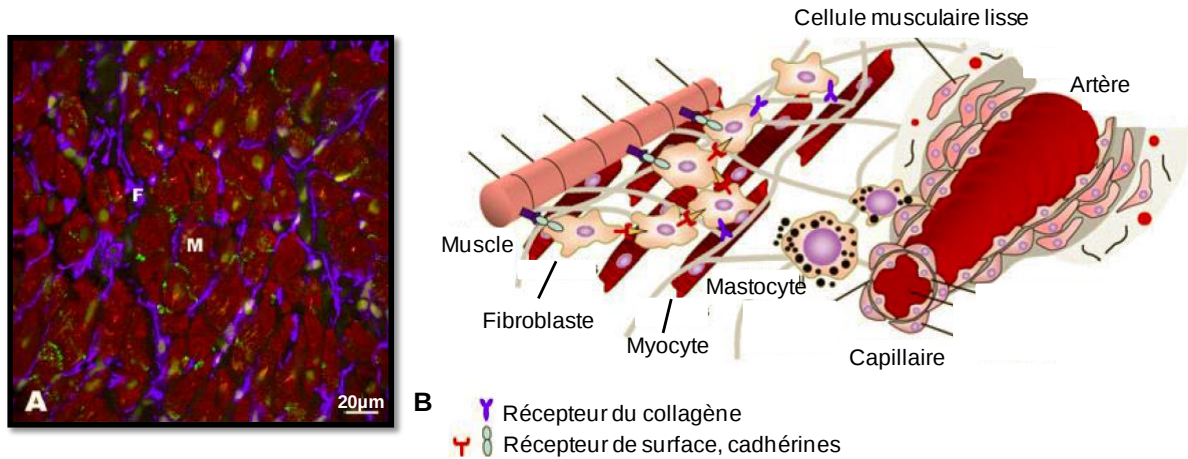


Figure 7. Composition histologique du tissu myocardique. L'observation au microscope confocal d'une section transverse de myocarde ventriculaire de mouton **(A)** montre la présence de myocytes (M) immunomarqués pour la myomésine (en rouge). Les myocytes possèdent des interactions avec la MEC du cœur notamment avec les fibroblastes (F) immunomarqués pour la vimentine (en bleu). Les noyaux des myocytes sont marqués au DAPI (4'-6 diamidino-2-phenylindole) et représentés par des spots jaunes pâles. La représentation schématique de la composition histologique du myocarde **(B)** met en évidence la présence de différents types cellulaires en relation grâce à des protéines transmembranaires telles que les intégrines et les cadhérines. *Adapté de (Baudino et al., 2006; Camelliti et al., 2005).*

Dans le cœur sain, les myocytes occupent environ 75% du volume du myocarde mais ne constitue qu'une minorité en termes de quantité (Baudino et al., 2006). En effet, les myocytes ne représentent environ que la moitié des cellules dans le cœur de nouveau né. Après la naissance, la proportion des myocytes diminue et ne représente plus qu'un tiers des cellules totales au détriment des fibroblastes (Kohl et al., 2005).

a) Les cellules musculaires

Les cardiomyocytes constituent les cellules musculaires myocardiques retrouvées dans la paroi des ventricules et des oreillettes, responsables de l'activité contractile du cœur. La taille des myocytes est différente selon les cavités cardiaques. Les cellules issues des oreillettes sont plus petites que les cellules des ventricules.

Dans cette thèse, notre attention se portera seulement sur les cardiomyocytes provenant des ventricules.

Les cardiomyocytes ventriculaires ont une forme cylindrique allongée et fusiforme avec un diamètre compris entre 10 et 20 μm . La taille des cellules issues de ventricule est variable mais en moyenne elles mesurent 100 μm de long (**Figure 8**).



Figure 8. Cardiomyocytes ventriculaires de cochon. Les cardiomyocytes ventriculaires sont isolés grâce à la technique de perfusion en Langendorff. Les cellules sont observées au microscope Nikon® eclipse 80i. Résultats obtenus en laboratoire.

Chaque fibre musculaire est formée d'une chaîne de plusieurs myocytes multinucléés connectés entre eux par des disques intercalaires formant un syncytium fonctionnel (**Figure 9**).

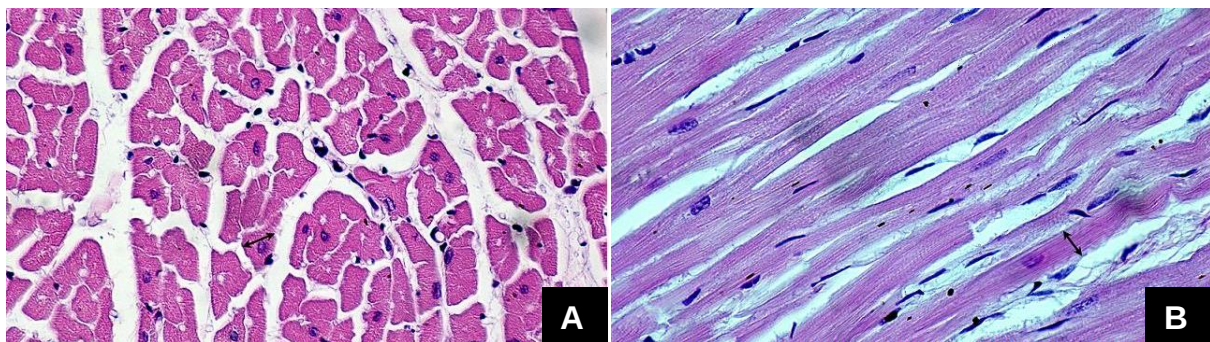


Figure 9. Représentation de coupes histologiques de myocarde de VG de lapin (x40). Section transverse (A) et longitudinale (B) colorées à l'hématoxyline éosine montrant l'organisation des myocytes en fibres. Adapté de (Noszczyk-Nowak et al., 2009).

Les cardiomyocytes possèdent une membrane plasmique appelée sarcolemme délimitant le milieu extracellulaire du cytoplasme. Le sarcolemme présente de nombreuses invaginations : les tubules transverses (tubule T) permettant la transmission de l'onde électrique dans l'épaisseur de la cellule proche du réticulum sarcoplasmique (RS) indispensables au couplage excitation-contraction (Soeller and Cannell, 1999) (cf. Section les

INTRODUCTION

Tubules transverses). De nombreux canaux ioniques, échangeurs, pompes, transporteurs et récepteurs avec des protéines d'adhésion sont présents au niveau des tubules T.

b) Les cellules non musculaires

On retrouve différents types de cellules autres que les myocytes : les cellules cardionectrices, les cellules musculaires lisses (CMLs) et endothéliales composant la paroi des vaisseaux coronaires, les fibroblastes sécrétant le collagène formant la MEC, les adipocytes et les cellules nerveuses.

Les cellules cardionectrices : elles constituent le système cardionecteur à l'origine d'un influx électrique et le propageant dans le myocarde. Le système cardionecteur se compose de deux éléments structuraux avec d'un côté « les nœuds » organisés en amas cellulaire formant le tissu nodal, et de l'autre « les faisceaux ».

Les cellules nodales sont des cellules de forme fasciculaire, de petites tailles avec un réseau fibrillaire discret et un cytoplasme riche en glycogène. Elles se rassemblent en amas au sein du tissu conjonctif et participent à la formation du nœud sino-atrial (NSA) et du nœud auriculo-ventriculaire (NAV).

Les éléments fasciculaires s'organisent en réseau de fibres afin de constituer les faisceaux de His et le réseau de Purkinje. La taille des cellules de Purkinje varie selon l'espèce (*Ono et al., 2009*). Par exemple chez les Ongulés, les cellules de Purkinje représentent une population de cellules plus volumineuses que celles des cardiomyocytes. Elles disposent d'un cytoplasme très riche en glycogène présentant des myofibrilles en périphérie (*Dun and Boyden, 2008*).

Les cellules cardionectrices sont dotées d'une automaticité cardiaque.

Les cellules musculaires lisses : elles ont une forme allongée, sont mononucléées et de taille variable avec une longueur moyenne de 100 µm et une largeur de 15 µm. Leur cytoplasme contient des myofibrilles permettant d'assurer un cycle de contraction-relaxation nécessaire au bon fonctionnement de la vasomotricité artérielle. Les CMLs constituent la paroi des vaisseaux du cœur : les vaisseaux coronariens. Elles sont présentes dans la couche musculaire médiane du vaisseau appelée média. La média est entourée d'une tunique interne qualifiée d'intima et d'une tunique externe, l'adventice.

Les cellules endothéliales : elles ont une forme aplatie, sont mononucléées avec une largeur de 20 µm et un diamètre de 1 µm. Elles reposent sur une lame basale et constituent la tunique interne des vaisseaux coronariens (l'intima). Elles tapissent également

la paroi interne des cavités c'est-à-dire l'endocarde mais aussi les valvules cardiaques. Le rôle majeur des cellules endothéliales est d'assurer le contrôle du tonus musculaire. En effet, elles produisent un composant vasodilatateur : le monoxyde d'azote qui induit une relaxation des CMLs et une vasodilatation à l'échelle du vaisseau. Les cellules endothéliales jouent un rôle d'hémostase. Elles sont capables d'empêcher la formation de caillots sanguins grâce à leurs propriétés anti-thrombotiques (expression de thrombomodulines) et anti-plaquettaires (production de prostacyclines).

Les fibroblastes : ils représentent deux tiers des cellules du tissu myocardique. Les cellules ont une forme fusiforme avec de longs prolongements cytoplasmiques.

En condition physiologique, les fibroblastes cardiaques jouent un rôle central dans le fonctionnement du cœur normal et contribuent aux propriétés structurales, biochimiques, mécaniques et électriques du cœur (*Goldsmith et al., 2004*).

Ce sont des cellules non-excitables ne générant pas de potentiel d'action. Cependant, elles présentent à leur membrane des canaux potassiques et des canaux cationiques non sélectifs (*Chilton et al., 2005; Walsh and Zhang, 2008*).

Des variations de concentration de potassium extracellulaire peuvent influencer le mécanisme de prolifération des fibroblastes. En effet, des études sur des fibroblastes cardiaques néonataux de rat ont montré qu'une diminution de la concentration extracellulaire en potassium engendrait une augmentation de la prolifération des fibroblastes. Au contraire, une augmentation de la concentration en ions potassiques extracellulaires provoquerait une diminution de la prolifération fibroblastique (*Chilton et al., 2005*).

De plus, des études expérimentales ont illustré que des modifications des propriétés électrophysiologiques des fibroblastes pouvaient entraîner une altération des propriétés de conduction au sein du myocarde (*Feld et al., 2002*). Les techniques d'immunohistochimie ont révélé la présence d'un couplage cellulaire fibroblaste-fibroblaste et fibroblaste-cardiomyocyte par l'intermédiaire de protéines : les connexines (cf. Section A l'échelle cellulaire : rôle des disques intercalaires) (*Rook et al., 1992*). Ainsi les fibroblastes peuvent contribuer à la transmission de la stimulation électrique au sein d'un réseau connecté grâce aux connexines. Gaudesius et ses collaborateurs ont mis en évidence que la propagation de l'onde électrique pouvait se faire sur des distances de 300 μm au sein d'une culture de fibroblastes (*Gaudesius et al., 2003*).

INTRODUCTION

Les fibroblastes participent à la formation des composantes de la MEC mais aussi à la sécrétion de facteurs (cytokines, facteurs de croissance, peptides vasoactifs) (*Deb and Ubil, 2014*). La MEC est un réseau de protéines qui entoure les cellules constitutives du myocarde et assure la cohésion cellulaire. Les composantes de la MEC sont multiples : protéines structurales, adhésives, protéoglycanes et enzymes. La MEC est formée d'une substance fondamentale comprenant des glycosaminoglycanes (longues chaînes de polysaccharides) qui peuvent s'associer avec des protéines pour former des protéoglycanes. Ces complexes macromoléculaires sont liés au collagène assurant ainsi l'architecture de la MEC. Les fibroblastes sécrètent des protéines structurales telles que le collagène, l'élastine et des protéines adhésives comme la fibronectine. Principalement, les fibroblastes synthétisent du collagène de type I et III alors que les collagènes de type IV et VI sont synthétisés par les cardiomyocytes. Les collagènes de type I et III représentent 90% du collagène total du cœur (*Eghbali et al., 1989*). Leur rôle est de transmettre les forces au travers du myocarde et de maintenir une structure tridimensionnelle du tissu durant le cycle contraction-relaxation. Cependant, au travers de ce réseau connecté, les fibroblastes pourraient générer une discontinuité de la conduction de l'onde électrique pouvant être à l'origine d'arythmies (*Kawara et al., 2001*).

La fibronectine est une glycoprotéine structurale possédant des sites de liaisons avec les protéoglycanes et le collagène. Elle contrôle la croissance et la différenciation cellulaire et joue également un rôle dans l'organisation de la MEC avec la disposition du collagène.

Les metalloprotéinases (MMP) présentes dans la MEC sont des enzymes protéolytiques capables de dégrader la MEC. Elles sont sécrétées sous forme latente et nécessitent une activation pour exercer une activité protéolytique. En condition physiologique, l'activité des MMP est plutôt basse. Leur activation s'effectue sous l'action de facteurs de croissance et de facteurs chimiques tels que les cytokines de l'inflammation.

Les fibroblastes expriment de nombreux récepteurs notamment des récepteurs aux cytokines du type TNF- α (*tumor necrosis factor- α*), TGF- β (*transforming growth factor- β*), IL-1 (*interleukine-1*) (*Porter and Turner, 2009*), des récepteurs à l'angiotensine II et à l'endothéline qui peuvent moduler la composition de la MEC (*Diaz-Araya et al., 2015*).

En condition pathologique, les fibroblastes jouent un rôle dans le remodelage cardiaque. Ils peuvent sécréter des protéines de la MEC, des MMP et des cytokines de l'inflammation en réponse à une agression environnementale comme l'étirement mécanique (*MacKenna et al., 2000; Porter and Turner, 2009*). En effet, lorsque la paroi cardiaque est soumise à un stress mécanique, la prolifération des fibroblastes génère une forte sécrétion des différents

composants de la MEC provoquant la mise en place d'un processus de fibrose dite réparatrice ou réactive à l'origine de dysfonctionnement cardiaque (*Weber and Brilla, 1991*). Dans un modèle de rat hypertendu soumis à une surcharge de pression constante, des études ont montré une surexpression du gène codant pour le collagène de type I dans les ventricules générant ainsi la mise en place d'une fibrose dite réparatrice (*Bing et al., 1997*). On observe une dérégulation du renouvellement des composants de la MEC, une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes avec l'expression de protéines contractiles comme l' α -SMA (α -smooth muscle actin) (*Gabbiani, 1998*).

Les adipocytes : ils participent à la formation du tissu adipeux qui se présente sous différentes formes avec des propriétés biochimiques et fonctionnelles distinctes : le tissu adipeux blanc prédominant chez l'Homme, le tissu adipeux brun et le tissu adipeux médullaire. Les adipocytes blancs ont une forme polygonale avec un diamètre de 70 μ m chez un sujet normo-pondéré. La cellule est occupée par une unique vacuole permettant le stockage des triglycérides (TG). Le rôle de ces cellules est multiple : assurer le métabolisme lipidique et l'homéostasie énergétique, participer à la réponse immunitaire et inflammatoire, contribuer au tonus vasculaire et à l'angiogénèse.

Au niveau du cœur, de nombreux panicules adipeux sont observés tels que le tissu adipeux épicardique (TAE) (**Figure 10A**) et le tissu adipeux périvasculaire (TAVP). Par contre, l'accumulation de tissu graisseux dans les sites non classiques est qualifiée de « graisses ectopiques » (*Despres et al., 2008*). L'hypertrophie, l'inflammation, la fibrose et l'incapacité du tissu adipeux sous cutané à stocker le surplus d'acides gras sont impliqués dans le développement de ces graisses ectopiques (*Britton and Fox, 2011*).

Le TAE dérivant du mésoderme splanchnique se développe plus ou moins selon les espèces : il est présent abondamment chez les cœurs de cobaye, lapin, grands mammifères et l'Homme alors qu'il est peu développé dans le cœur de rongeur. Dans les conditions physiologiques chez l'Homme adulte, cette graisse adipeuse épicardique se localise préférentiellement à la base du VD, l'origine de l'AP et de l'aorte. En condition pathologique ou sous l'influence de facteurs environnementaux, génétiques ; le tissu adipeux s'accumule sur les bords de la paroi libre du VD puis atteint la face postérieure des deux ventricules, les deux oreillettes, ainsi que la pointe du VG et pour finir se localise autour des principaux vaisseaux coronaires. Le cœur se retrouve ainsi enveloppé de toute part d'un manchon fibreux plus ou moins épais pouvant à des degrés excessifs altérer la forme de l'organe.

INTRODUCTION

Un dépôt de tissu adipeux est également localisé au niveau de l'endocarde sous forme de plaque plus ou moins épaisse et d'étendue variable.

Des études nécropsiques, échographiques et radiologiques ont montré que l'augmentation du TAE dépendait de l'âge, du tour de taille et du poids du cœur (*Sacks and Fain, 2007*). Dans le cas pathologique, une infiltration de graisse peut s'effectuer en profondeur et gagner les espaces inter-fasciculaire du myocarde sous forme de raies étroites. Les adipocytes infiltrant le tissu myocardique se présente sous forme de larges cellules de forme ovale polygonale ou sphérique contenant de grosses gouttelettes de matière huileuse et riche en acides gras insaturés (*Iacobellis et al., 2005*) (**Figure 10B**).

Il existe une relation anatomique et fonctionnelle entre le TAE et le myocarde. Des études expérimentales réalisées sur le cobaye ont montré qu'une augmentation de l'activité lipolytique considérée comme une source d'acide gras permettrait de répondre à une demande énergétique importante du muscle cardiaque notamment en condition d'ischémie (*Marchington et al., 1989*). Ce tissu graisseux participe aussi à l'augmentation des processus inflammatoires par la sécrétion d'adipokines et peut perturber la séquence d'activation de l'activité électrique. En effet, dans le cas de la dysplasie arythmogène du VD, une infiltration graisseuse et fibreuse est observée générant des zones de bloc anatomique perturbant la propagation de l'influx électrique et pouvant conduire à des arythmies ré-entrantes (cf. Section Troubles de conduction et du rythme) (*Thiene et al., 2007*). Les infiltrations provoquent des lésions résiduelles multiples comme une dégénérescence graisseuse du myocarde qui se caractérise par une disparition par atrophie des fibres musculaires en faveur des adipocytes.

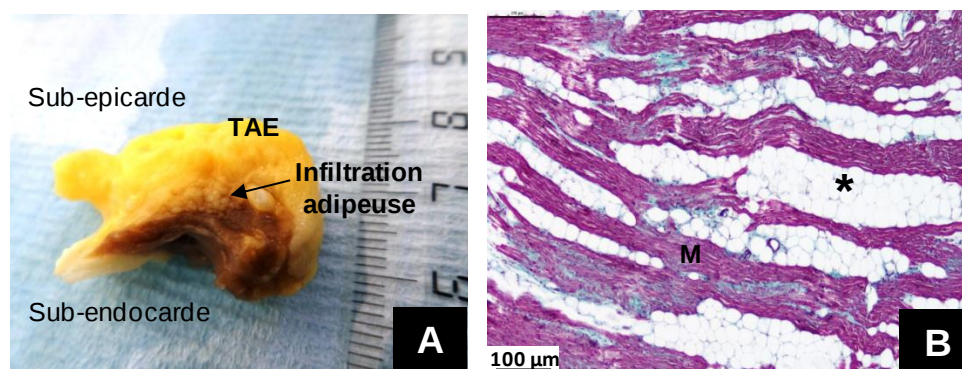


Figure 10. Tissu adipeux cardiaque. Sur un échantillon d'infundibulum pulmonaire ou RVOT issu de cœur humain, il est mis en évidence le tissu adipeux épigardique (TAE) d'une épaisseur considérable ainsi que les infiltrations adipeuses au sein du myocarde (**A**). L'infiltration d'adipocytes blancs au sein du myocarde est observée sur des coupes histologiques de RVOT de 8 µm d'épaisseur colorée au trichrome Masson et à l'hémalun (**B**). Cette infiltration adipeuse se présente sous la forme de raies de cellules ovales (*) s'intercalant entre les myocytes cardiaques (M). *Résultats obtenus en laboratoire.*

3. Le cœur dans sa fonction : la pompe cardiaque

Le cœur est une pompe dotée d'une activité rythmique permanente illustrée par l'alternance de phases de contraction ou systole et de phases de relaxation ou diastole. Le cœur assure la circulation sanguine générale permettant de fournir les substances indispensables à l'ensemble des cellules telles que les nutriments, les hormones, les facteurs du système immunitaire et les gaz respiratoires nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme. Elle permet d'éliminer les déchets produits par les cellules des divers organes comme le dioxyde de carbone (CO_2) et l'urée.

Décrite pour la première fois par Harvey en 1628, la circulation sanguine générale est un circuit fermé qui se décompose en deux systèmes circulatoires fonctionnant simultanément : la circulation systémique assurée par le « cœur gauche » et la circulation pulmonaire perpétuée par le « cœur droit » (**Figure 11A**).

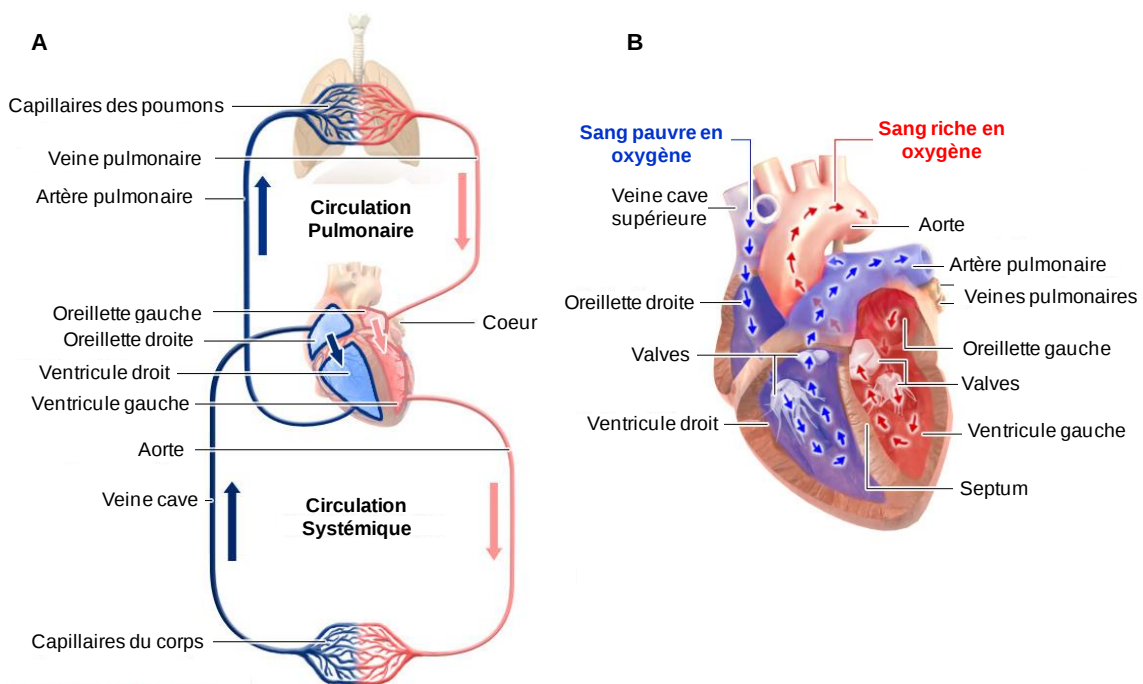


Figure 11. Circulation sanguine générale. Le cœur correspond à la pompe du système cardiovasculaire et est capable de propulser le sang dans l'ensemble de la circulation artérielle (**A**). Le « cœur gauche » assure la circulation systémique dont le rôle est de collecter le sang enrichi en dioxygène (O_2) issu des poumons par les veines pulmonaires afin de le diriger vers les autres organes par l'intermédiaire de l'aorte. Le « cœur droit » est responsable de la circulation pulmonaire dont la fonction est d'amener le sang pauvre en O_2 aux poumons par l'AP afin de le réoxygéner (**B**). Adapté du site internet <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

a) La circulation systémique

La circulation systémique appelée grande circulation correspond à la circulation du sang oxygéné (O_2) partant du « cœur gauche » et se propageant à l'ensemble de

INTRODUCTION

l'organisme. Elle inclut également le retour du sang pauvre en O_2 issu des différents organes au cœur droit. Durant la diastole, l'OG reçoit le sang chargé en O_2 par l'intermédiaire des veines pulmonaires (**Figure 11B**). Le sang passe ensuite à travers la valvule mitrale afin de remplir le VG. Lors de la systole, le sang est éjecté dans l'aorte avant d'atteindre les artères pour circuler ensuite dans les artérioles. Les échanges gazeux avec les cellules des différents organes sont réalisés au niveau des réseaux capillaires. Le retour à l'OD du sang désoxygéné s'effectue par le système veineux : les veines caves supérieure et inférieure (**Figure 11A**). Au sein de la circulation systémique, la pression artérielle physiologique en diastole est de 80 mmHg et en systole 120 mmHg.

b) La circulation pulmonaire

La circulation pulmonaire appelée petite circulation correspond à la circulation du sang appauvri en O_2 expulsé par le « cœur droit » vers les poumons où il sera oxygéné à nouveau. Elle assure également la circulation du sang riche en O_2 émanant des poumons vers le cœur « gauche » (**Figure 11A**).

Le sang chargé en CO_2 issu de la circulation systémique, est collecté par le réseau veineux puis amené à l'OD par l'intermédiaire des veines caves supérieures et inférieures. Lorsque la pression de l'OD est supérieure à la pression du VD, la valvule tricuspide s'ouvre et le sang pénètre dans le VD.

Durant la systole, le VD propulse le sang vers le tronc pulmonaire qui se divise en deux APs gauche et droite. Le sang passe ensuite dans les artérioles puis dans le réseau de capillaires pulmonaires qui entourent les alvéoles pulmonaires.

Des échanges alvéolo-capillaires permettent de substituer le CO_2 par de l' O_2 (**Figure 12**). Le sang à nouveau enrichi en O_2 retourne par les veinules puis les veines pulmonaires vers l'OG. La circulation pulmonaire est un système vasculaire à faible pression artérielle soit 10 mmHg en diastole et 20 mmHg en systole.

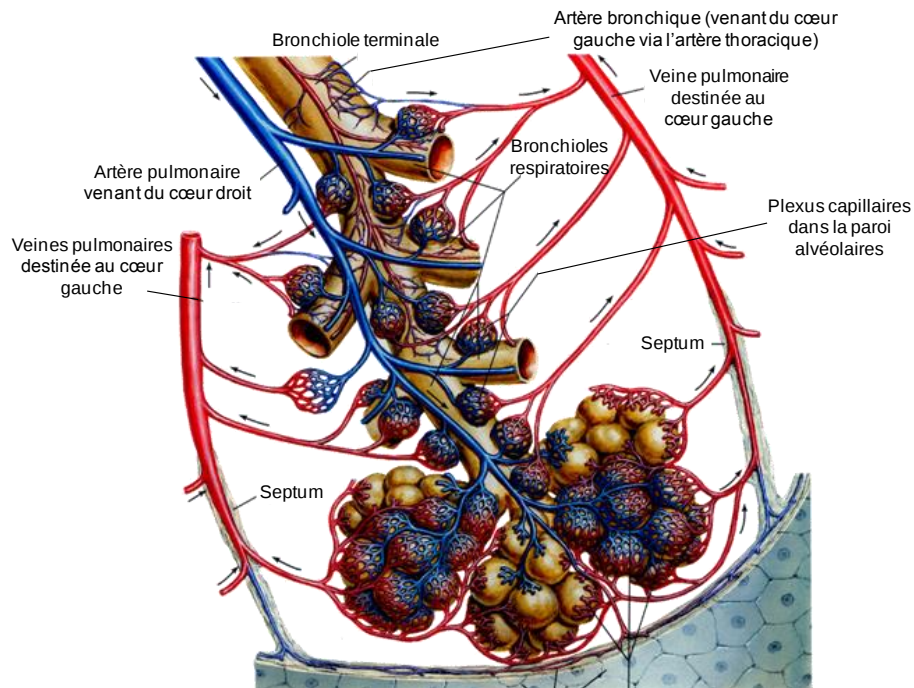


Figure 12. Echanges alvéolo-capillaires lors de la circulation pulmonaire. Le sang appauvri en O_2 arrive au niveau des alvéoles pulmonaires par l'intermédiaire des APs qui se ramifient en capillaires pulmonaires. La paroi des alvéoles et des capillaires forment la membrane alvéolo-capillaire dont le rôle est de former une barrière air-sang. Les échanges s'effectuent par diffusion à travers la barrière alvéolo-capillaire. L' O_2 diffuse des alvéoles vers le sang et le CO_2 du sang vers les alvéoles. Une fois le sang enrichi en O_2 , il repart vers le cœur grâce aux veines pulmonaires. Adapté du site internet <http://queenofqalbs.wordpress.com>.

c) La circulation coronarienne

La perfusion sanguine du cœur s'effectue par la circulation coronarienne. Il s'agit d'artères nourricières qui longent la surface externe du cœur et pénètrent dans le myocarde. Les artères coronaires gauche et droite d'un diamètre d'environ 3 mm prennent leur origine à la base de l'aorte juste au-dessus de la valvule aortique et alimentent les cavités cardiaques par l'intermédiaire de ramifications (**Figure 13**).

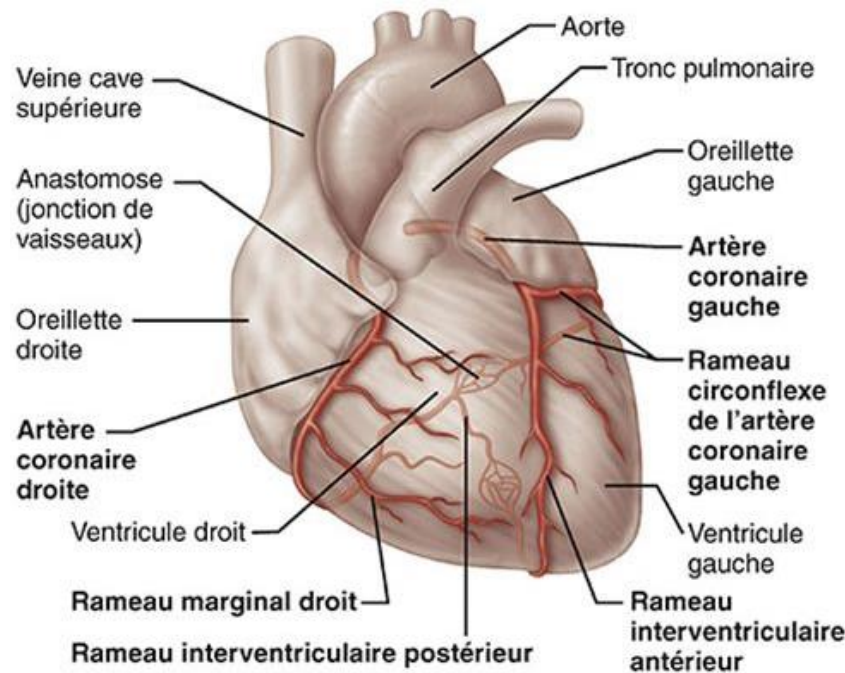


Figure 13. Représentation anatomique de la vascularisation coronarienne du cœur. Les artères coronaires droite et gauche prennent leur origine à la base du tronc aortique. Ces deux artères coronaires donnent naissance à de nombreuses ramifications afin de perfuser l'ensemble du myocarde. La vascularisation du « cœur droit » dépend essentiellement de l'artère coronaire droite. Le « cœur gauche » est perfusé par l'artère coronaire gauche et ses ramifications. *Adapté du site internet www.lookfordiagnosis.com.*

L'artère coronaire droite descend entre l'AP et l'aorte jusqu'à la jonction auriculo-ventriculaire droite pour atteindre la face antérieure du cœur, et donne naissance à une collatérale : l'artère marginale droite dirigée vers l'apex de l'organe. Elle vascularise la partie inférieure du cœur. L'artère coronaire droite s'incurve ensuite vers la gauche et poursuit son trajet dans le sillon inter-ventriculaire postérieur afin de donner la volumineuse artère inter-ventriculaire postérieure. Elle irrigue la partie postérieure jusqu'à l'apex du cœur. L'artère inter-ventriculaire postérieure abandonne des branches perforantes pour le septum inter-ventriculaire : les branches septales inter-ventriculaires.

L'artère coronaire gauche se ramifie en deux branches terminales principales : l'artère inter-ventriculaire antérieure (IVA) ou branche descendante antérieure et l'artère circonflexe. L'IVA prend son origine à la partie haute du sillon inter-ventriculaire antérieur et descend dans ce sillon afin de se terminer au niveau de l'apex du cœur dans sa partie antérieure. L'artère circonflexe se dirige vers la jonction auriculo-ventriculaire, contourne le bord gauche du cœur et se termine à la face postéro-latérale du VG. Durant son trajet, elle donnera naissance à de nombreuses artères collatérales nourrissant les faces latérales et postérieures du VG.

L'artère coronaire droite s'anastomose avec les branches circonflexes et inter-ventriculaires antérieures de l'artère coronaire gauche.

La vascularisation du cœur est différente selon l'artère coronaire considérée. L'artère coronaire droite vascularise l'OD, le VD, et le tiers postéro-inférieur du septum inter-ventriculaire. L'artère coronaire gauche perfuse l'OG, la face antérieure et la portion latérale du VG ainsi que les deux tiers antéro-supérieur du septum inter-ventriculaire.

L'artère coronaire droite perfuse le VD durant toute la durée du cycle cardiaque car le VD possède un myocarde peu développé (*Kinch and Ryan, 1994*). L'artère coronaire gauche vascularise majoritairement le VG lors de la diastole car la paroi de ce dernier est très développée empêchant ainsi son irrigation lors de la systole à cause de l'occlusion des artères. Le VD possède une résistance à l'ischémie plus importante que le VG (*Haddad et al., 2008b*). En effet, la consommation en O₂ du VD correspond à la moitié de celle du VG. De plus, le flux sanguin des coronaires rapporté à la masse musculaire est inférieur dans le VD.

Parallèlement au réseau artériel, le système veineux coronarien permet de drainer les déchets gazeux et métaboliques qui se jettent dans le sinus coronaire menant dans l'OD.

d) Cycle cardiaque

Le cycle cardiaque est défini comme l'ensemble des événements survenant entre deux contractions successives du cœur. L'alternance des phases diastolique et systolique détermine les fonctions hémodynamiques ventriculaires. Ces fonctions peuvent être segmentées en quatre phases : remplissage ventriculaire, contraction isovolumétrique, éjection, relaxation isovolumétrique dont le cycle complet forme une boucle pression-volume (**Figure 14**).

Le fonctionnement du cycle cardiaque est sous la dépendance de l'activité électrique du cœur. La propagation de l'onde électrique va déclencher une onde de contraction qui se propage dans tout le myocarde.

INTRODUCTION

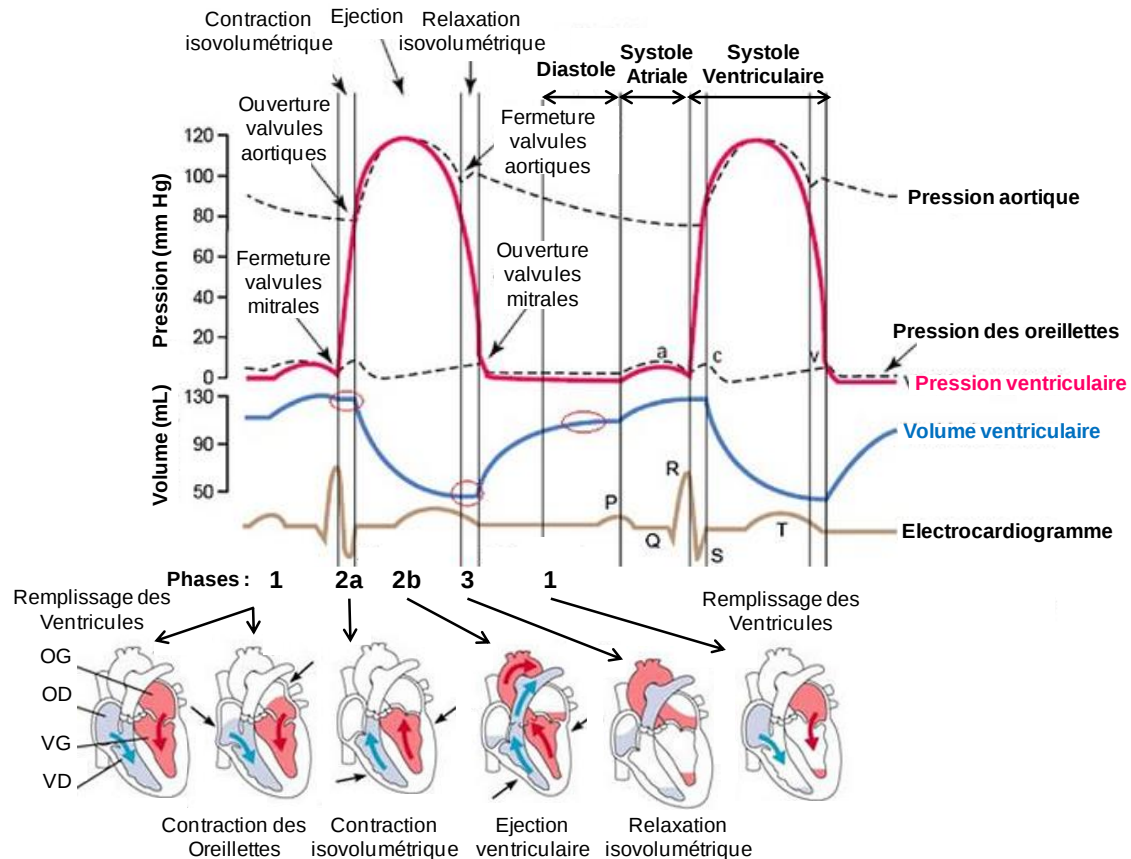


Figure 14. Diagramme de Wiggers. Le cycle cardiaque est représenté par la succession de quatre étapes : la contraction des oreillettes et le remplissage des ventricules (1), la contraction isovolumétrique des ventricules (2a), l'éjection ventriculaire (2b), la relaxation isovolumétrique des ventricules (3). Au cours de la révolution cardiaque, des variations de pression et de volume au sein des cavités sont mises en évidence. La pression de l'OG, du VG et de l'aorte ainsi que le volume du VG sont représentés en fonction du cycle cardiaque. Le diagramme intègre également un électrocardiogramme démontrant le lien entre les activités électriques et mécaniques du cœur. *Adapté de (Guyton and Hall, 2006).*

Phase 1: le remplissage ventriculaire et contraction des oreillettes :

Durant la phase 1, l'ouverture des valvules auriculo-ventriculaires (valvules mitrale et tricuspide) permet le passage passif et rapide du sang des oreillettes vers les ventricules car la pression intra-auriculaire est supérieure à la pression intra-ventriculaire créant ainsi un appel de sang dans les ventricules. Par la suite, sous l'effet de la contraction simultanée des oreillettes (systole auriculaire), le reste du sang est chassé de manière active dans les ventricules. D'après l'électrocardiogramme (ECG), la systole auriculaire commence après l'onde P (**Figure 14**). Au fur et à mesure de l'avancé dans le cycle, le remplissage des ventricules s'effectue plus lentement du fait de l'augmentation du volume et de la pression ventriculaire. A la fin de cette première phase, le VG contient 80 mL/m^2 et la pression du VG est de 10 mmHg. La pression intra-ventriculaire devient supérieure à la pression intra-auriculaire et les valvules auriculo-ventriculaires se ferment.

Phase 2a : la contraction isovolumétrique :

Durant la phase 2a, de très brève durée, les ventricules sont isolés du reste du cœur car les valvules auriculo-ventriculaires viennent de se fermer et les valvules aortique et pulmonaire ne sont pas encore ouvertes. Les fibres myocardiques des ventricules se contractent, les pressions intra-ventriculaires augmentent, environ 20-25 mmHg dans le VD et 80-85 mmHg dans le VG. Cette augmentation de pression intra-ventriculaire induit l'ouverture des valvules sigmoïdes.

Phase 2b : la systole :

Lors de la phase 2b, sous l'effet de la forte pression intra-ventriculaire, le sang présent dans les ventricules est brusquement éjecté simultanément dans l'aorte par le VG, et dans l'AP par le VD. Lorsque les pressions aortique et pulmonaire deviennent supérieures aux pressions intra-ventriculaires, les valvules aortique et pulmonaire se ferment signant ainsi l'arrêt de l'éjection ventriculaire. Sur l'ECG, la systole ventriculaire débute à la fin de l'onde R et se termine juste après l'onde T.

Phase 3 : la relaxation isovolumétrique :

Pour la seconde fois, les cavités ventriculaires sont isolées lors de la phase 3. En effet, les valvules aortique et pulmonaire viennent de se fermer et les valvules mitrale et tricuspide ne sont pas encore ouvertes. Les fibres myocardiques des ventricules se relâchent, on parle de diastole ventriculaire. La pression intra-ventriculaire diminue rapidement jusqu'à devenir inférieure à la pression intra-auriculaire. De ce fait, les valvules mitrale et tricuspide s'ouvrent, le cycle de remplissage ventriculaire recommence.

II/ Activité électrique du cœur

Les contractions cardiaques sont induites par une onde électrique modulant la fréquence cardiaque. Elle permet d'assurer une contraction synchrone des cellules ainsi que la chronologie des contractions des différentes régions du cœur, afin que ce dernier puisse fournir un débit sanguin nécessaire aux besoins de l'organisme.

INTRODUCTION

1. Le potentiel d'action cardiaque

a) Définition

Les cellules cardiaques sont délimitées par une membrane plasmique présentant des canaux ioniques qui par leur ouverture laissent transiter des ions générant alors différents courants électriques contribuant à la genèse du potentiel d'action (PA).

La membrane plasmique joue un rôle fondamental dans les processus électriques. Le passage d'un ion à travers la membrane plasmique par l'intermédiaire d'un canal ionique dépend du gradient électrochimique qui reflète la charge, et du gradient de concentration de l'ion considéré, ainsi que du potentiel de membrane (E_m). On appelle potentiel d'équilibre d'un ion, le potentiel membranaire pour lequel le gradient électrique contrebalance le gradient de concentration de cet ion.

Le potentiel d'équilibre peut être calculé par l'équation de Nernst :

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_e}{C_i}$$

E_{ion} correspond au potentiel d'équilibre de l'ion considéré, R à la constante des gaz parfaits, T à la température absolue, F à la constante de Faraday, z à la valence de l'ion, et C_e , C_i aux concentrations extra- et intracellulaire de l'ion.

Au repos les myocytes cardiaques sont des cellules polarisées dues aux différences de concentration d'ions de part et d'autre de la membrane. En effet, les cardiomyocytes sont des réservoirs de potassium (K^+) qui baignent dans un milieu riche en sodium (Na^+), calcium (Ca^{2+}) et chlore (Cl^-) mais pauvre en potassium (**Tableau 1**).

Concentration intracellulaire	Concentration extracellulaire
$[K^+]_i = 104-180 \text{ mM}$	$[K^+]_e = 5,4 \text{ mM}$
$[Na^+]_i = 10 \text{ mM}$	$[Na^+]_e = 140 \text{ mM}$
$[Ca^{2+}]_i = 1.10^{-4} \text{ mM}$	$[Ca^{2+}]_e = 1-3 \text{ mM}$
$[Cl^-]_i = 20 \text{ mM}$	$[Cl^-]_e = 117 \text{ mM}$

Tableau 1. Composition ionique du milieu intra- et extracellulaire d'un cardiomyocyte.

Une forme modifiée de l'équation de Nernst connue sous le nom d'équation de Goldman-Hodgkin-Katz permet de calculer le potentiel d'équilibre pour un système composé de plusieurs types d'ions avec des perméabilités de membrane différentes.

L'équation de Hodgkin-Goldman-Katz correspond à :

$$E_m = \frac{RT}{F} \times \ln \frac{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}$$

E_m correspond au potentiel de membrane et P_x au coefficient de perméabilité des différents ions.

De ce fait, au repos, l'intérieur d'un myocyte de mammifère est chargé négativement par rapport au milieu extérieur, car la membrane est plus perméable aux ions K^+ maintenant une différence de potentiel de membrane d'environ -90 mV.

Le potentiel de membrane oscille entre une phase de dépolarisation au cours de laquelle il s'éloigne du potentiel de repos et devient plus positif et une phase de repolarisation caractérisée par un retour à un potentiel de repos.

Les différents acteurs participant à la variation du potentiel de membrane sont les canaux ioniques, les échangeurs et les pompes. Les canaux ioniques pour la plupart sont dits « voltage dépendant » ou « dépendant du potentiel » car leur ouverture et fermeture dépendent du potentiel de membrane. L'échangeur sodium-calcium (NCX) et la pompe sodium-potassium (Na^+/K^+) contribuent au potentiel de membrane et sont dits « électrogéniques ». NCX permet l'échange de trois ions Na^+ contre un ion Ca^{2+} . Le sens des échanges dépend du potentiel de membrane et de la concentration des ions. Le bilan est une charge positive qui sort ou rentre dans la cellule créant respectivement un courant sortant repolarisant ou entrant dépolarisant. La pompe Na^+/K^+ permet un transport actif (consommation d'ATP) asymétrique de trois ions Na^+ à l'intérieur de la cellule contre la sortie de deux ions K^+ . Le bilan est donc une charge positive qui sort de la cellule créant un courant net sortant repolarisant ($I_{Na/K}$).

b) Potentiel d'action ventriculaire

Le PA des myocytes ventriculaires s'effectue en cinq phases successives (**Figure 15**) faisant intervenir différents canaux ioniques (**Tableau 2**).

INTRODUCTION

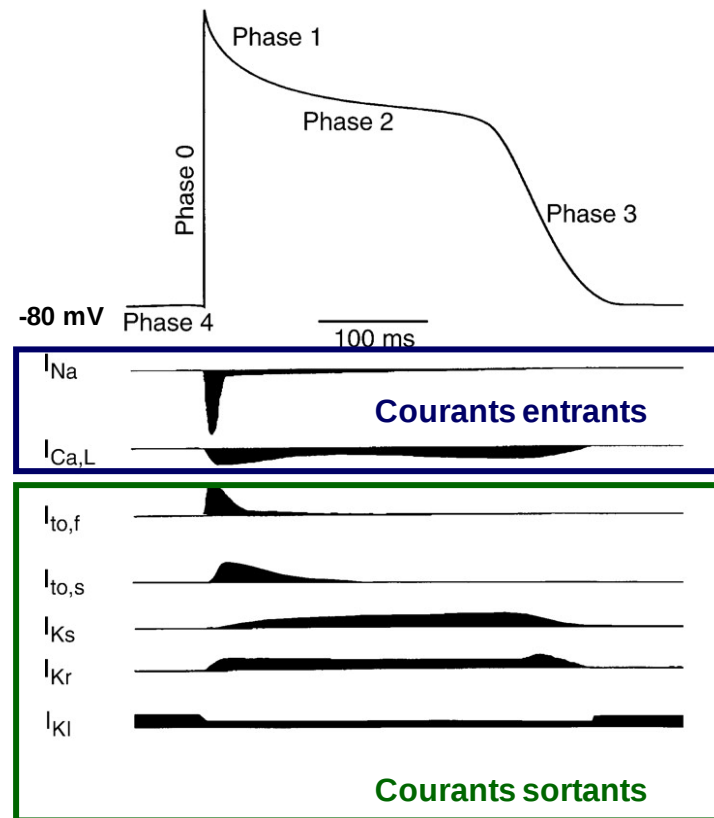


Figure 15. Représentation schématique du PA d'un cardiomyocyte ventriculaire. Le PA ventriculaire se décompose en cinq phases successives. Les différents courants ioniques entrants et sortants participant au PA sont représentés. *Adapté de (Nerbonne and Kass, 2005).*

La **phase 0** ou phase de dépolarisation est très rapide, de l'ordre de la milliseconde (1-2 ms). La dépolarisation de la membrane à une valeur de -70 mV induite par un stimulus externe, active les canaux sodiques dépendant du potentiel ($\text{Na}_v1.5$ isoforme cardiaque prédominant). L'ouverture des canaux sodiques dépendant du potentiel entraîne un courant entrant rapide (I_{Na}) amenant le potentiel de membrane à une valeur positive de +30 mV. Au fur et à mesure que le potentiel de membrane augmente, le courant I_{Na} s'inactive déterminant en partie la durée de la phase de dépolarisation du PA (Fozzard, 2002). Le courant I_{Na} contribue à synchroniser la systole des cardiomyocytes.

La **phase 1** correspond à la phase de repolarisation précoce rapide appelée « *spike-and-dome* » (pointe et dôme) ou *notch* (encoche) (**Figure 15**). Cette phase est caractérisée par l'inactivation des canaux sodiques, empêchant l'entrée de Na^+ dans la cellule, et par l'activation rapide (2-3 ms) de canaux potassiques dépendant du potentiel générant un courant potassique transitoire sortant (I_{to}). Le courant I_{to1} est responsable de l'amplitude de la repolarisation précoce, indépendant de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mais sensible au bloqueur 4-aminopyridine (Barry and Nerbonne, 1996). Ce courant se divise en deux composantes : $I_{\text{to,slow}}$ ($I_{\text{to,s}}$) et $I_{\text{to,fast}}$.

($I_{to,f}$) se différenciant par leur temps d'inactivation (*Nerbonne, 2000*). Le courant $I_{to,s}$ est généré par le canal $K_v1.4$ et possède une cinétique d'inactivation lente (environ 200 ms). Le courant $I_{to,f}$ est sous la dépendance des canaux $K_v4.2$ et $K_v4.3$ avec une cinétique d'inactivation plus rapide de l'ordre de 100 ms.

Un autre courant I_{to2} de faible amplitude est présent dans les cardiomyocytes ventriculaires de certaines espèces animales comme le cochon, le chien, le lapin et le mouton (*Li et al., 2003; Zygmunt and Gibbons, 1991*). C'est un courant sensible au $[Ca^{2+}]_i$, qui laisse passer les ions Cl^- . A la différence du courant I_{to1} , il est insensible au bloqueur 4-aminopyridine.

La **phase 2** ou phase de plateau est caractérisée par l'équilibre entre un courant calcique entrant dépolarisant (I_{Ca}) et des courants potassiques sortants repolarisants (I_K).

Le courant entrant est un courant calcique de type L (I_{CaL}) généré par des canaux dépendant du potentiel ($Ca_v1.2$) ou récepteurs aux dihydropyridines (DHPRs) (*Benitah et al., 2010*). Le seuil d'activation des DHPRs se fait à un potentiel membranaire de -30 mV et ils s'inactivent lentement au cours du PA. Leur inactivation est un facteur déterminant dans la limitation de la durée du PA et dans le déclenchement de la phase 3 de repolarisation. Il existe d'autres canaux calciques dépendant du potentiel de membrane : les canaux de type T, N et P. On retrouve préférentiellement les canaux calciques de type P et N dans les neurones. Les canaux calciques de type T sont absents dans les myocytes ventriculaires sains et sont plutôt exprimés dans les oreillettes, les fibres de Purkinje, le NSA, le NAV et les ventricules immatures (*Vassort et al., 2006*). Le courant I_{CaL} joue un rôle dans le déclenchement de la contraction cardiaque en provoquant la libération du Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS), on parle du phénomène de libération de calcium induite par le calcium (CICR, *Calcium-induced calcium release*) (*Fabiato and Fabiato, 1978*) (cf. Section Dynamique du couplage excitation contraction).

NCX participe également à la phase de plateau du PA. Pour des potentiels membranaires inférieurs au potentiel d'inversion de NCX ($E_{Na/Ca}$), l'échangeur fonctionne en mode inversé. Il permet donc la sortie de trois ions Na^+ dans le milieu extracellulaire et l'entrée d'un ion Ca^{2+} dans le cytoplasme générant un courant sortant I_{NCX} . Le fonctionnement de l'échangeur en mode inversé est limité dans le temps. En effet, l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ due à l'activation du courant I_{CaL} et du relargage de Ca^{2+} du RS modifie le sens de fonctionnement de NCX avec l'extrusion d'un ion Ca^{2+} et l'entrée de trois ions Na^+ favorisant un courant entrant dépolarisant I_{NCX} (*Weber et al., 2002*).

INTRODUCTION

L'inactivation progressive des canaux responsables du courant I_{to} durant la phase 1 est compensée par la mise en place d'un courant sortant positif : le courant potassique retardé (I_K). Le courant I_K possède deux composantes : une composante rapide (I_{Kr}) et une composante lente (I_{Ks}) générées respectivement par $K_v11.1$ (ou HERG) et par $K_v7.1$. Le courant I_{Kr} est activé rapidement à des potentiels de membrane plus négatifs que le courant I_{Ks} . Le courant I_{Ks} est caractérisé par une cinétique d'activation lente pour des potentiels supérieurs à -10 mV (*Sanguinetti and Jurkiewicz, 1990*).

La **phase 3** correspond à la phase de repolarisation dite « tardive ».

Le courant I_{CaL} s'inactive alors que les courants potassiques retardés I_{Kr} , I_{Ks} continuent en raison de leur temps d'activation. Le déséquilibre des courants ioniques en faveur des courants sortants I_K permet aux cardiomyocytes de se repolariser. Par la suite, le courant potassique à rectification entrante (I_{K1}) est activé à des potentiels inférieurs à -50 mV. Il devient dominant et favorise le retour au potentiel de repos alors que les courants I_{Kr} et I_{Ks} s'inactivent.

La **phase 4** qualifiée de phase de potentiel de repos est caractérisée par un potentiel de membrane négatif (proche de -90 mV). Au cours de cette phase, le potentiel de membrane dépend principalement de la perméabilité aux ions K^+ via la pompe Na^+/K^+ , et le courant I_{K1} médié par le canal potassique $Kir2.1$ (*Barry and Nerbonne, 1996*).

Type de canal	Gène	Nom du courant	Type de courant	Activation	Inactivation	Rôle dans le PA
$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i>	Sodique I_{Na}	Dépolarisant	Très rapide	Lente	Phase 0
$Ca_v1.2$	<i>CACNA1C</i>	Calcique I_{CaL}	Dépolarisant	Modérée	Lente	Phase 2 (1 et 3)
$K_v4.2$ $K_v4.3$	<i>KCND2</i> <i>KCND3</i>	Potassique $I_{to,f}$	Repolarisant	Rapide	Rapide	Phase 1
$K_v1.4$	<i>KCNA4</i>	Potassique $I_{to,s}$	Repolarisant	Rapide	Modérée	Phase 1
$K_v7.1$	<i>KCNQ1</i>	Potassique I_{Ks}	Repolarisant	Très lente	Très lente	Phase 3 (Phase2)
$K_v11.1$ (HERG)	<i>KCNH2</i>	Potassique I_{Kr}	Repolarisant	Modérée	Lente	Phase 3 (Phase2)
$Kir2.1$	<i>KCNJ2</i>	Potassique I_{K1}	Repolarisant			Phase 3 et Phase 4

Tableau 2. Caractéristiques des principaux canaux ioniques participant au PA des myocytes ventriculaires. Adapté de (Nerbonne and Kass, 2005).

c) Hétérogénéité des potentiels d'action au sein du myocarde ventriculaire

L'hétérogénéité de la durée des PAs (APD, *Action potential duration*) ventriculaires provient d'une expression différentielle des canaux ioniques suivant l'espèce et la région du ventricule considérée. L'épaisseur du myocarde peut être subdivisée en deux régions : le sub-épicaire et le sub-endocarde dont les cellules possèdent des propriétés électrophysiologiques distinctes. Plusieurs études controversées dénoteraient la présence d'une troisième région : le midmyocarde composé de cellules M (*Antzelevitch et al., 1991*). Ces cellules seraient proches électriquement des cellules de Purkinje. Elles seraient situées dans les couches sous-épicaïques profondes des parois libres des ventricules et dans les couches sous-endocardiïques profondes du septum et des trabéculations.

En condition physiologique, les cellules sub-endocardiïques provenant des ventricules ont une densité faible en courant I_{to} qui se caractérise par l'absence d'une morphologie en forme de « *spike-and-dome* » (pointe et dôme) lors de la phase 1 de repolarisation précoce. A l'inverse, les cellules sub-épicaïques présentent une forte densité de courant I_{to} , se caractérisant par un aspect marqué en pointe de la phase 1 du PA. Les cellules M auraient une densité modérée en courant I_{to} avec un profil morphologique intermédiaire de la phase 1 du PA.

De ce fait, il existe un gradient transmural du courant I_{to} au sein de la paroi ventriculaire. Ce gradient est en partie responsable de la présence d'APDs longs en ENDO et courts en EPI (*Antzelevitch et al., 1991*) (**Figure 16**).

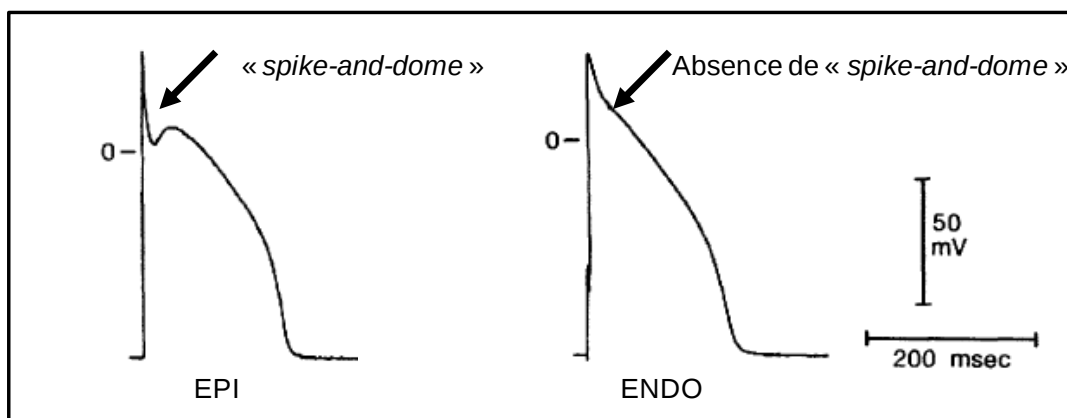


Figure 16. Régionalisation des PAs issus de myocytes ventriculaires. Les enregistrements de PA ont été obtenus grâce à des microélectrodes à une fréquence de stimulation de 3,3 Hz sur des myocytes isolés des couches sub-épicaïques (EPI) et sub-endocardiïques (ENDO) de la paroi libre de VG issus de cœurs de chiens. La forme en « *spike-and-dome* » de la phase 1 de repolarisation caractéristique de la présence du courant I_{to} est plus marquée dans l'EPI que l'ENDO. Adapté de (*Liu et al., 1993*).

INTRODUCTION

Des études expérimentales ont montré la présence d'une densité de courant I_{to} cinq à six fois plus élevée au niveau de l'EPI comparé à l'ENDO (*Liu et al., 1993*).

La densité des courants I_{Ks} et I_{Kr} est également variable au sein des cellules myocardiques des ventricules : elle est plus faible en ENDO en comparaison avec l'EPI, contribuant ainsi à un gradient transmural de l'APD (*Bryant et al., 1998*). Une étude expérimentale sur le cœur de chien a pu mettre en évidence une densité de courant I_{Ks} plus importante dans les cellules sub-épicaudiques et sub-endocardiques que dans les cellules M (*Liu and Antzelevitch, 1995*). La faible densité du courant I_{Ks} au niveau des cellules M serait responsable de l'augmentation de la durée des APDs dans le midmyocarde.

Des études récentes sur le cœur humain ont montré une différence du niveau d'expression des canaux $Na_v1.5$ au sein de la paroi myocardique avec une expression plus importante au niveau de l'ENDO (*Gaborit et al., 2007*) suggérant ainsi la présence d'un gradient transmural du courant I_{Na} (*Osadchii, 2012*).

La raison physiologique de l'hétérogénéité des APDs réside dans le fait de synchroniser la phase de repolarisation des cardiomyocytes des différentes couches du myocarde. De ce fait, les PAs sont plus longs en ENDO en comparaison à l'EPI.

Dans le cœur, il existe une différence d'APD entre la base et l'apex des ventricules. Les APDs sont plus longs au niveau de la base et plus courts au niveau de l'apex (*Janse et al., 2012; Watanabe et al., 1985*). Cette différence serait liée à une expression des canaux $K_v7.1$ et un courant I_{Ks} plus importants au sein de l'apex (*Szentadrassy et al., 2005*).

Des expériences menées chez la souris ont montré une différence régionale des courants I_{to} entre l'apex et le septum du VG. Le courant $I_{to,f}$ est observé dans les deux régions mais avec une densité plus forte au niveau de l'apex. Par contre, le courant $I_{to,s}$ est présent uniquement dans le septum du VG (*Xu et al., 1999*).

Une hétérogénéité inter-ventriculaire au sein des PAs est également décrite. Les APDs enregistrés dans le VD sont plus courts que ceux enregistrés dans le VG. Cette différence est attribuée à une densité des courants I_{to} et I_{Ks} plus élevée dans le VD (*Volders et al., 1999*).

De plus, il a été démontré que la phase 1 du PA avec sa forme caractéristique en « *spike-and-dome* » est plus marquée au sein du VD par rapport au VG dans les myocytes issus des couches sub-épicaudiques de cœurs de chiens suggérant ainsi une plus forte densité de courant I_{to1} dans l'EPI du VD (*Di Diego et al., 1996*).

d) Adaptation de la durée du potentiel d'action à la fréquence cardiaque

La fréquence cardiaque module les APDs. Une augmentation de la fréquence cardiaque se traduit par une diminution des APDs (*Franz et al., 1988*). Ce mécanisme d'adaptation est important afin de maintenir une activité électrique et mécanique normale du cœur notamment dans les conditions d'exercice physique.

Les variations des APDs en fonction de la fréquence cardiaque peuvent être représentées sous la forme d'une courbe dite de restitution. La courbe de restitution représente les APDs en fonction de la durée du cycle cardiaque (BCL, *Basic cycle length*) ou de l'intervalle diastolique (DI, *Diastolic interval*). L'intervalle diastolique correspond à l'intervalle de temps compris entre la fin de la repolarisation cellulaire et l'arrivée du prochain stimulus électrique. La longueur du cycle cardiaque représente l'intervalle de temps entre deux excitations successives tel que $BCL = APD + DI$.

Aux fréquences lentes, la courbe de restitution est presque horizontale indiquant une absence de modulation de l'APD alors qu'aux fréquences rapides, la pente de la courbe augmente en raison du raccourcissement de l'APD lié à la cinétique d'activation et inactivation des canaux ioniques.

A des fréquences cardiaques élevées, les canaux responsables du courant I_{CaL} n'ont pas le temps de revenir à leur forme activable avant le prochain PA. Il en résulte un courant I_{CaL} de faible densité contribuant aux raccourcissements des APDs (*Li et al., 1999*). De plus, une augmentation de la concentration extracellulaire en potassium est observée à des fréquences élevées de stimulation, favorisant l'augmentation du courant I_{K1} et donc une diminution des APDs (*Kunze, 1977*). Il a été démontré que les courants I_{Kr} et I_{Ks} contribuent au raccourcissement des APDs lors d'une augmentation de la fréquence cardiaque (*Jurkiewicz and Sanguinetti, 1993*). L'augmentation de la fréquence de stimulation est accompagnée de l'augmentation de la concentration intracellulaire en sodium conduisant à un fonctionnement de l'échangeur NCX en mode inverse générant un courant I_{NCX} sortant (*Janvier et al., 1997*).

e) Période réfractaire

La période réfractaire (PRT) est définie comme étant la période durant laquelle un nouveau PA ne peut pas être déclenché normalement. Les périodes réfractaires sont un facteur déterminant de l'excitabilité cardiaque.

La première partie de la PRT correspond à la période réfractaire absolue (PRA) qui se déroule entre le début de la phase de dépolarisation (phase 0) jusqu'au milieu de la phase de

INTRODUCTION

repolarisation (phase 3) (**Figure 17**). Il est impossible durant la PRA de déclencher un PA du fait de l'inactivation des canaux sodiques dépendant du potentiel.

La deuxième partie de la PRT est appelée période réfractaire relative (PRR). Elle correspond à la fraction de temps durant laquelle un début de réponse peut être initié. Au terme de cette période, il y a une récupération de l'excitabilité normale de la cellule. De manière plus détaillée, la PRR se divise en deux parties : une première partie où se développent des potentiels incapables de se propager et une deuxième partie où apparaissent des potentiels capables de se propager. Il s'agit d'une période dite vulnérable car elle peut être à l'origine des arythmies.

On appelle période réfractaire effective (PRE) l'intervalle de temps au bout duquel on obtient un PA propagé. Sa durée correspond à celle de la PRA plus environ la moitié de la PRR.

D'un point de vue expérimental ou clinique, la détermination de la PRE consiste à appliquer dans le myocarde ventriculaire, après une dépolarisation basale, une excitation de plus en plus prématurée et à mesurer l'intervalle de temps au bout duquel cette excitation devient inefficace. Les diverses PRR correspondent au temps requis par les cardiomyocytes pour retrouver leur état d'excitabilité.

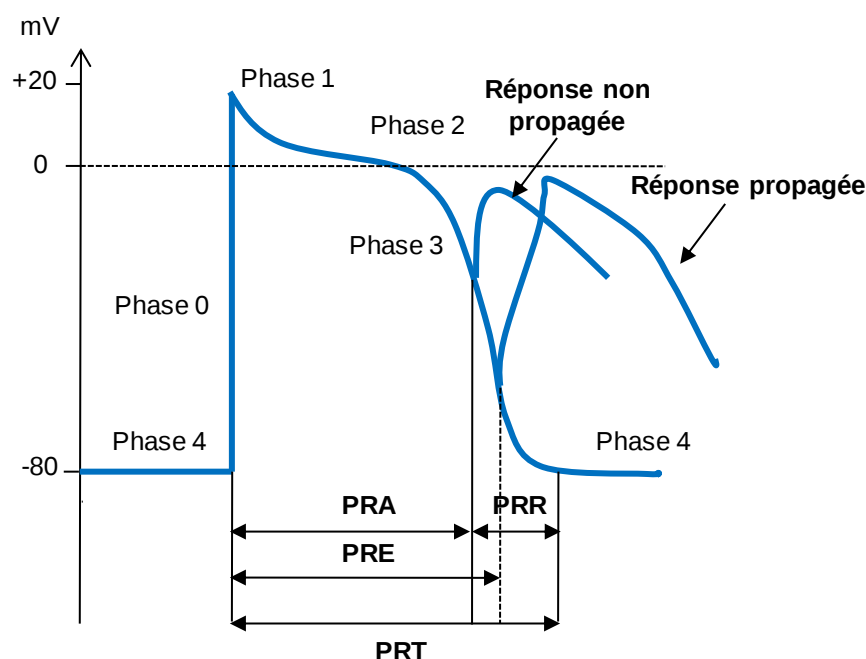


Figure 17. Représentation schématique de la période réfractaire d'un cardiomyocyte ventriculaire. La PRT se compose de la PRA et de la PRR. La PRA représente la période durant laquelle le cardiomyocyte est inexcitable quelque soit l'intensité de la stimulation car les canaux sodiques sont fermés. La PRR correspond à la période pendant laquelle la cellule est hypoexcitable du fait de la réactivation des canaux sodiques. Durant cette période, une réponse propagée peut être générée. La PRE s'arrête avec la première réponse propagée. Entre la fin de la PRA et la fin de la PRE se situe une zone où une stimulation de la cellule entraîne des réponses trop faibles en amplitude pour être propagées. Ces réponses restent alors locales.

2. Automatisme et système de conduction cardiaque

a) A l'échelle du cœur entier

Le cœur est doté d'un automatisme cardiaque lui conférant des propriétés de contraction spontanée, régulière et autonome à une fréquence de 70 battements par minute en moyenne chez l'homme adulte au repos. L'automatisme cardiaque correspond à la production d'une activité électrique spontanée et répétitive grâce aux cellules cardionectrices qui sont capables de se dépolariser de manière autonome.

En condition physiologique, l'activité électrique est initiée au niveau du nœud de Keith et Flack ou NSA et se propage à l'ensemble du cœur via le système de conduction selon un schéma précis (James, 1967) (**Figure 18A**).

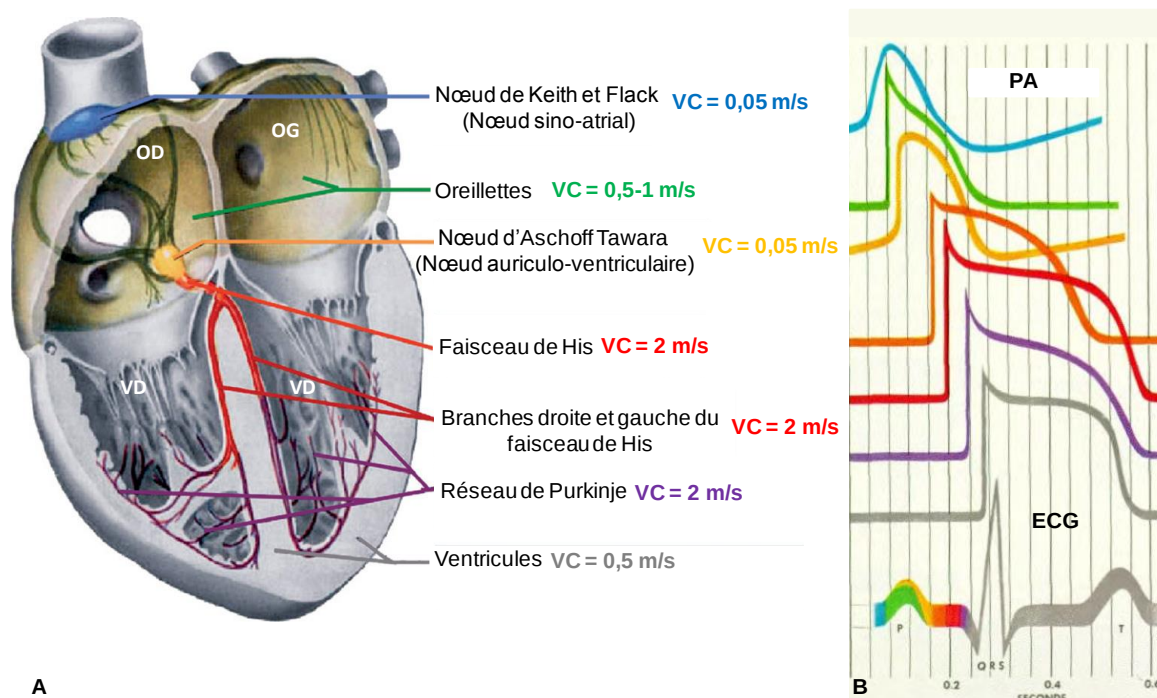


Figure 18. Système de conduction électrique du cœur. Représentation schématique des cavités cardiaques et des voies de conduction ainsi que des vitesses de conduction de l'influx électrique (VC) (**A**). Le foyer de l'automatisme cardiaque se trouve au niveau du NSA. L'onde de dépolarisation se propage à l'ensemble des deux oreillettes jusqu'au NAV. Puis, elle se propage dans le faisceau de His qui se divise en deux branches pour chaque ventricule et s'arborise en de nombreuses ramifications appelées fibres de Purkinje. Représentation des différents profils de PA cardiaque et de l'ECG de surface lors d'un battement cardiaque (**B**). *Adapté de (Netter, 1993).*

Le NSA est situé au niveau de la jonction de la veine cave supérieure avec l'OD. Il possède une activité intrinsèque de dépolarisation automatique imposant au cœur un rythme dit sinusal : on parle de centre rythmogène ou pacemaker cardiaque (Baruscotti and Robinson,

INTRODUCTION

2007). La vitesse de conduction (VC) de l'influx électrique est lente au niveau du NSA, environ 0,05 m/s.

Le système nerveux végétatif autonome module l'activité du NSA suivant les besoins de l'organisme : une accélération et un ralentissement du rythme s'effectuent respectivement sous l'effet du système nerveux sympathique et parasympathique.

L'onde de dépolarisation se propage ensuite à l'ensemble du myocarde auriculaire avec une vitesse de 0,5-1 m/s et déclenche la contraction coordonnée des oreillettes. La conduction inter-auriculaire est réalisée au niveau du faisceau de Bachmann. Puis, l'activité électrique est transmise au nœud d'Aschoff Tawara ou NAV situé dans la partie supérieure du septum inter-ventriculaire. Le temps de conduction de l'onde de dépolarisation est ralenti au niveau du NAV d'environ 100 ms, délai nécessaire au remplissage des ventricules par la contraction des oreillettes. Le NAV permet de synchroniser et de filtrer l'influx électrique des oreillettes vers les ventricules (Anderson et al., 2013). L'onde d'activation arrive dans le faisceau de His qui constitue la seule voie de communication physiologique entre les oreillettes et les ventricules. Le faisceau de His se divise en deux branches distinctes avec une branche pour chaque ventricule et se ramifie en un réseau de fibre de Purkinje. Les fibres de Purkinje forment de multiples jonctions avec le myocarde ventriculaire et transmettent l'influx qui va dépolariser les cardiomyocytes ventriculaires générant ainsi une contraction simultanée des deux ventricules. La vitesse de conduction est très rapide dans le faisceau de His et dans le réseau de Purkinje de l'ordre 2 m/s (Kreuzberg et al., 2006). La contraction des ventricules se déroule 200 ms après celle des oreillettes.

b) A l'échelle cellulaire : rôle des disques intercalaires

Les cardiomyocytes sont connectés les uns aux autres par des disques intercalaires présents aux extrémités longitudinales de chaque cellule. Ces disques sont composés de jonctions communicantes ou « jonction Gap » permettant la conduction électrique et chimique. D'autre part, les disques comprennent des jonctions adhérentes et des desmosomes assurant le couplage mécanique permettant la contraction coordonnée du myocarde.

Les jonctions communicantes sont un ensemble de canaux jonctionnels composés de connexines (Cxs) (Severs et al., 2008) (**Figure 19A**).

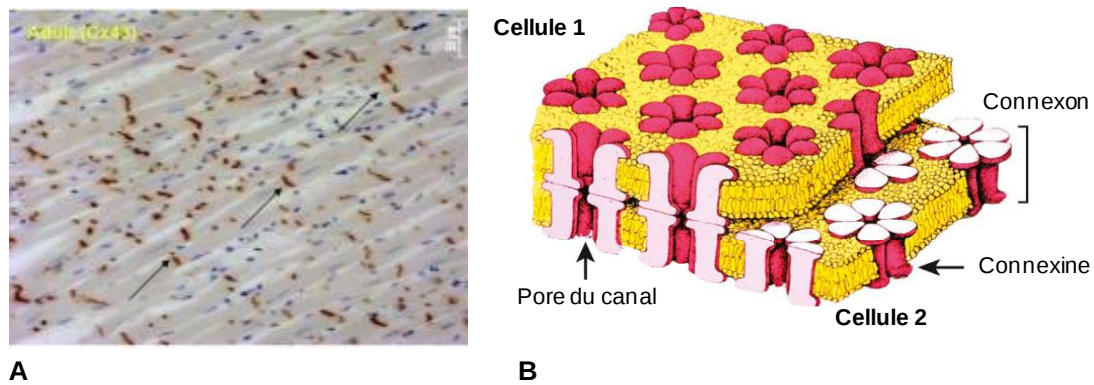


Figure 19. Représentation des jonctions communicantes. Les interactions entre les cardiomyocytes s'effectuent au niveau des disques intercalaires (flèches) comme en témoigne l'immunomarquage de la Cx43 sur des coupes de VG de cœur adulte de rat **(A)**. Les Cxs s'assemblent en hexamères formant des connexons qui s'arriment aux connexons de la cellule voisine formant des canaux intercellulaires appelés jonctions communicantes **(B)**. *Adapté de (Makowski et al., 1984; Morita et al., 2011).*

Les Cxs sont des protéines transmembranaires assemblées au nombre de six pour former un hémicanal ou connexon comportant un pore d'une dimension de 1-1,5 nm. Deux connexons de myocytes adjacents se font face de part et d'autre de la membrane afin de former un canal jonctionnel permettant le passage d'ions et de petites molécules d'un poids moléculaire inférieur à 1 kDa tels que des seconds messagers : Inositol triphosphate, Adénosine monophosphate cyclique (AMPC) (*Makowski et al., 1984; Saez et al., 2003*) **(Figure 19B)**.

Dans le myocarde sain, on retrouve des jonctions gap au niveau de la membrane latérale mais en faible proportion (*Luke and Saffitz, 1991*). Les jonctions communicantes sont très nombreuses au niveau des myocytes ventriculaires avec une densité de 8000-10000 canaux par micromètre au niveau des disques intercalaires.

L'onde d'excitation ne se propage pas uniquement selon l'axe longitudinal des fibres myocardiques mais dans un système complexe tridimensionnel. La transmission longitudinale (dans l'axe des fibres) de l'influx électrique d'un myocyte à un autre myocyte via les jonctions communicantes est facilitée par rapport à la transmission transversale (perpendiculaire à l'axe des fibres) générant ainsi un phénomène d'anisotropie de conduction. En effet, la VC de l'influx électrique propagé dans le sens longitudinal des fibres myocardiques est supérieure à la VC du signal électrique propagé dans le sens transverse des fibres (*Hubbard et al., 2007*). Le ratio d'anisotropie représenté par le rapport de la VC longitudinale (V_L) sur la VC transversale (V_T) est de 2-3 dans le VG et de 10 dans les oreillettes (*Spach, 1983*).

INTRODUCTION

Le degré de couplage jonctionnel dépend de différents facteurs : le nombre de canaux de jonctions fonctionnels présents à la membrane ; leurs compositions en Cxs ainsi que leurs propriétés électriques. Des mécanismes de phosphorylations et de déphosphorylations régulent également le couplage intercellulaire (*Solan and Lampe, 2009*).

Au niveau cardiaque, il a été identifié quatre types de Cxs : la connexine 45 (Cx45), la connexine 43 (Cx43), la connexine 40 (Cx40), la connexine 30.2 (Cx30.2) codées respectivement par les gènes *Gjy1*, *Gja1*, *Gja5* et *Gjd3*. La distribution des Cxs au sein du cœur est hétérogène (*Severs et al., 2008*) (**Figure 20**).

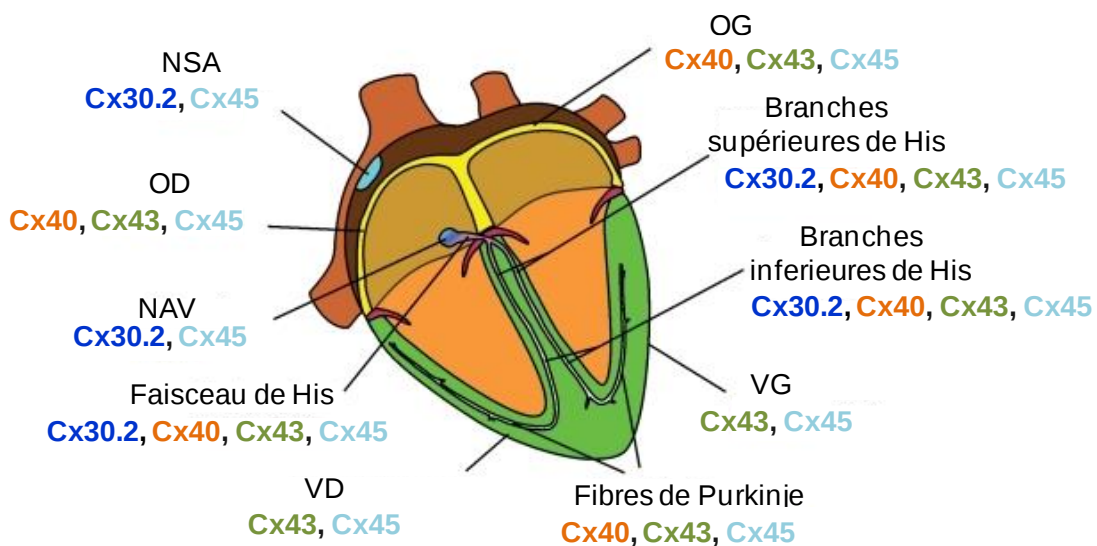


Figure 20. Expression des Cxs cardiaques dans le cœur sain de mammifère adulte. Au niveau du cœur de mammifère adulte, quatre types de Cxs sont exprimées : Cx30.2, Cx40, Cx43, Cx45. La Cx30.2 est fortement exprimée dans les tissus nodaux, et elle est présente en plus faible abondance dans le faisceau de His et ses branches. La Cx40 est présente dans le tissu auriculaire et le tissu conducteur ventriculaire (faisceau de His et fibres de Purkinje) et absente dans les ventricules. La Cx43 est synthétisée par les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires mais aussi par le tissu conducteur ventriculaire avec toutefois quelques restrictions. La Cx45 est exprimée dans les tissus nodaux, le système de conduction ventriculaire ainsi que les oreillettes et les ventricules. *Adapté de (Severs et al., 2008).*

La conductance ionique unitaire qui indique la facilité relative avec laquelle l'ion traverse un canal donné, est spécifique à chaque isoforme de Cx. La Cx40 présente la conductance unitaire la plus élevée avec une valeur de 200 pS, les Cx43 et 45 possèdent une conductance plus faible avec des valeurs respectives de 60-100 et 30 pS (*Jongsma and Wilders, 2000*). Ces valeurs dépendent des conditions expérimentales et du modèle cellulaire utilisé.

Dans le cadre de cette thèse qui porte sur l'étude du remodelage ventriculaire, nous nous intéresserons plus particulièrement à l'expression et au rôle de la Cx43.

Le nombre de canaux dans une jonction communicante varie également en fonction du tissu cardiaque, du stade de développement (embryonnaire, adulte) et de l'espèce. La Cx43 est prédominante dans le cœur adulte, elle est exprimée dans de nombreux tissus cardiaques (oreillettes, ventricules, fibres de Purkinje) sauf au niveau du NSA et NAV (*Desplantez et al., 2007*). Des études ont montré des variations de niveau d'expression d'isoformes de Cxs entre le cœur adulte et le cœur embryonnaire. Il a été observé lors du développement embryonnaire dans les ventricules de souris, des modifications du niveau d'expression de la Cx43. En effet, l'expression de la Cx43 est multipliée par 10 dans les ventricules entre le 14^{ème} jour post-conception et la première semaine post-partum pour après chuter de 20% chez la souris adulte (*Fromaget et al., 1990*). Lors du développement embryonnaire, l'absence de la Cx43 dans les cardiomyocytes prédisposerait à la formation d'anomalies morphologiques cardiaques (obstruction du RVOT) incompatibles avec la vie (*Reaume et al., 1995*). De ce fait, la Cx43 joue un rôle important dans la morphogénèse cardiaque.

De plus, il existe une hétérogénéité dans l'expression de la Cx43 au sein du RVOT embryonnaire ou adulte. En effet, il a été montré une absence d'expression de la Cx43 au sein du RVOT issu de cœurs embryonnaires de souris, pouvant être à l'origine de VC lentes dans le RVOT comparé au VD (*Boukens et al., 2013*). Dans le cœur adulte, le gène *Gja1* codant pour la Cx43 est exprimé en faible proportion au sein du RVOT par rapport aux ventricules, ce qui assure une conservation de la différence de VC entre le RVOT et le VD (*Boukens et al., 2013; Ou et al., 2005*).

De façon intéressante, il a été montré chez des souris mutantes homozygotes Cx43^{-/-} au stade fœtal, un ralentissement de la conduction de l'influx électrique d'abord dans le VD (15,5^{ème} jour post-conception) puis dans le VG (17,5^{ème} jour post-conception) et pour finir, la mort de l'animal quelques heures après la naissance (*Vaidya et al., 2001*).

Des différences de niveaux d'expression ventriculaire de la Cx43 ont été mises en évidence entre différentes espèces animales. Par exemple, chez la souris et le chien la Cx43 est moins abondante dans les myocytes des couches sub-épicaudiques que dans les myocytes issus des couches sub-endocardiques. Par contre, il n'y a pas de gradient transmural dans l'expression de la Cx43 chez le rat (*Boukens et al., 2009*). Des études ont montré chez l'animal sain comme le chien, la présence d'une expression hétérogène de la Cx43 à travers la paroi myocardique ventriculaire, pouvant être associée à une repolarisation inhomogène du muscle (*Poelzing et al., 2004*). Cette hétérogénéité est très prononcée lors de l'insuffisance

INTRODUCTION

cardiaque (IC) par la diminution de l'expression de la Cx43 au niveau de l'épicaarde, engendrant ainsi un découplage intercellulaire au travers la paroi musculaire. Ce découplage électrique peut être considéré comme un substrat arythmogène (*Poelzing and Rosenbaum, 2004*). En conséquence, une altération du niveau d'expression de la Cx43 associée à un remodelage local des jonctions dans le tissu ventriculaire est un facteur pro-arythmique (*Kontogeorgis et al., 2008*).

Des changements importants de niveau d'expression, de densité et de distribution des Cxs cardiaques ont été démontrés dans le cas de cardiomyopathie dilatée (*Dupont et al., 2001*), d'hypertrophie (*Peters et al., 1993*), et d'ischémie (*Boulaksil et al., 2010*). En général, l'expression de la Cx43 est diminuée et son adressage aux disques intercalaires perturbé en condition pathologique (*Severs et al., 2008*). Dans le cas d'une ischémie du myocarde, une déphosphorylation de la Cx43, un découplage électrique accompagné d'une altération de la distribution de la Cx43 avec une latéralisation de ces dernières sont observés (*Cheng et al., 2011*).

c) Mesure de l'activité électrique du coeur

L'électrocardiogramme (ECG) enregistre à la surface du torse les variations du potentiel résultant de l'activité électrique de l'ensemble des cellules cardiaques (**Figure 21**). Il est composé par la succession de cinq phases :

- Onde P correspondant à la phase de dépolarisation des oreillettes (la phase de repolarisation n'est pas visible car elle est masquée par le complexe QRS)
- Intervalle PQ ou PR représentant le délai de conduction électrique du NAV aux branches du faisceau de His
- Complexe QRS traduisant la dépolarisation des ventricules
- Segment ST indiquant la période durant laquelle les fibres ventriculaires contractiles sont entièrement dépolarisées (phase de plateau des potentiels d'action)
- Onde T correspondant à la repolarisation des ventricules

L'intervalle QT, défini comme le temps entre le début du complexe QRS et la fin de l'onde T, représente la durée de la dépolarisation et la repolarisation ventriculaire. La lecture de l'ECG permet de mettre en évidence des anomalies des voies de conduction intracardiaque, des troubles du rythme, des dysfonctions électriques caractéristiques de différentes pathologies telles que l'infarctus, l'hypertrophie ou la dilatation du cœur.

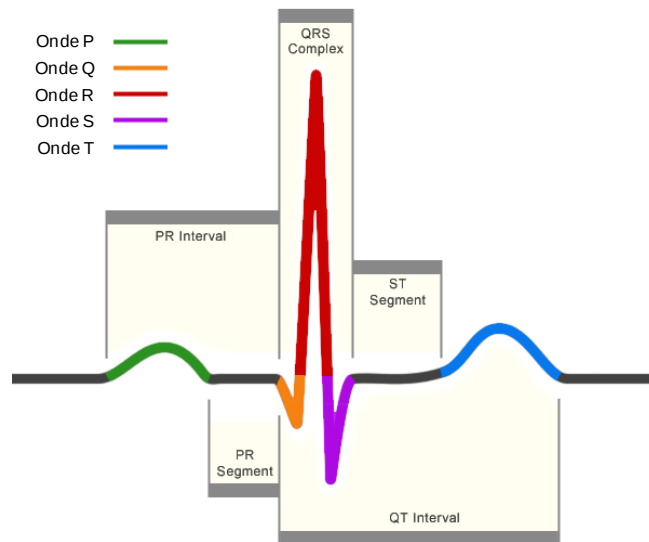


Figure 21. Représentation schématique d'un ECG. Adapté du site internet <http://research.vet.upenn.edu/smallanimalcardiology>.

3. Genèse des arythmies cardiaques

Les arythmies correspondent à des troubles du rythme cardiaque localisés ou diffus au sein du myocarde. Il existe divers grands types d'arythmies : tachycardie ventriculaire (TV), fibrillation ventriculaire et atriale (FV et FA) (**Figure 22**). La tachycardie est une accélération du rythme cardiaque alors que les fibrillations correspondent à une désorganisation totale de l'activité électrique.

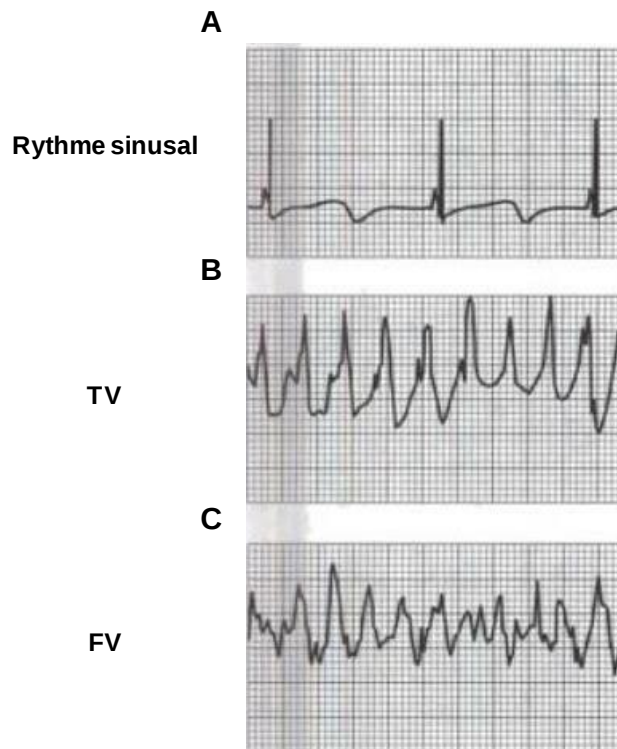


Figure 22. Exemples d'arythmies cardiaques. Représentation d'enregistrements d'ECG chez un sujet masculin âgé de 12 ans en rythme sinusal (A), lors d'un épisode de TV (B) et de FV (C). *Adapté de (Moss and Daubert, 2000).*

D'après le triangle de Coumel, la genèse des arythmies peut s'expliquer par trois facteurs qui interagissent entre eux (**Figure 23**) :

- le substrat arythmogène de nature électrophysiologique et/ou anatomique (cicatrices liées à la chirurgie, infarctus)
- la modification du milieu de nature neurohumorale (implication du système nerveux autonome), électrolytique (hypokaliémie) ou métabolique (ischémie, acidose)
- le facteur initiant, jouant le rôle de gâchette comme l'accélération de la fréquence cardiaque et la présence d'extrasystoles (anomalies du rythme les plus fréquentes correspondant à une contraction cardiaque prématurée)

Le substrat et sa gâchette répondent à des mécanismes électrophysiologiques qui peuvent être de natures différentes telles qu'une automaticité anormale, des activités déclenchées et des troubles de conduction.

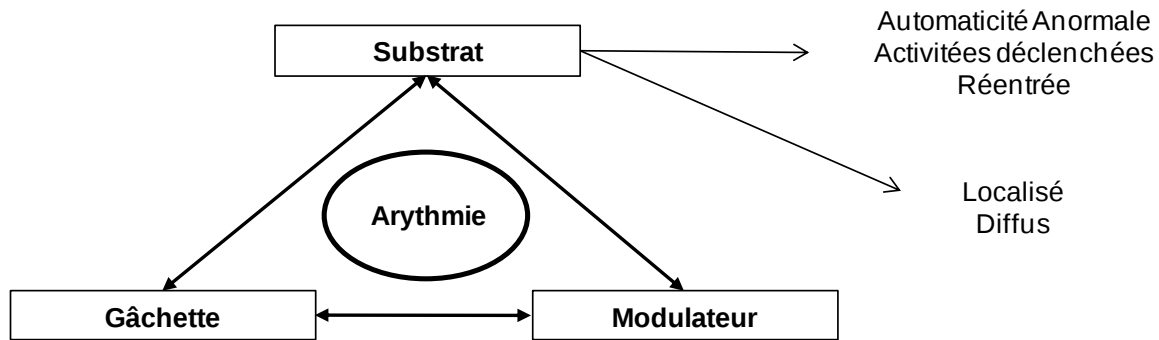


Figure 23. Triangle de Coumel. Les facteurs arythmogènes à l'origine d'une arythmie ont été schématisés par Coumel sous forme d'un triangle aux sommets duquel figurent les facteurs nécessaires à l'arythmogénèse : le substrat électrophysiologique et/ou anatomique, le facteur gâchette et les facteurs modulateurs.

a) Automatismes cardiaques anormaux

L'automatisme est la propriété de certaines cellules cardiaques d'autogénérer un PA en absence de stimulation électrique externe. Cette activité est liée à la dépolarisation diastolique spontanée causée par un courant ionique net entrant durant la phase 4 du PA qui amène le potentiel de membrane jusqu'au seuil de dépolarisation. Il s'agit du courant dit « pacemaker » ou « funny » (I_f) transporté par les ions Na^+ et K^+ et généré par le canal HCN4. Dans les conditions normales, le NSA exerce cette propriété d'automatisme avec la fréquence intrinsèque la plus rapide de sorte que l'activité des foyers accessoires situés en aval dans le NAV et les fibres de Purkinje reste latente.

L'automatisme anormal peut avoir lieu dans les cellules cardiaques comportant une dépolarisation diastolique spontanée mais également dans les myocytes auriculaires et ventriculaires pathologiques. Cet automatisme peut par exemple être stimulé par les agonistes β -adrénergiques ou par la diminution de la concentration extracellulaire en potassium. A un certain niveau de dépolarisation compris entre -10 et +10 mV et à des concentrations extracellulaires potassiques physiologiques, l'automatisme anormal peut être supprimé. Des études expérimentales menées sur un modèle de chien insuffisant cardiaque ont montré une augmentation de l'ARNm codant pour le canal HCN4 dans les oreillettes (Zicha *et al.*, 2005). Ce canal provoque une dépolarisation spontanée des cardiomyocytes auriculaires à l'origine d'épisodes de FA. Un autre exemple d'automaticité anormale localisée dans les veines pulmonaires peut de la même façon induire une FA (Chard and Tabrizchi, 2009; Haissaguerre *et al.*, 1998).

b) Activités déclenchées

Les activités déclenchées sont liées à la présence de post-dépolarisations qui sont des oscillations du potentiel de membrane au-delà de la phase de dépolarisation de la cellule pouvant conduire à des extrasystoles et potentiellement des tachycardies. La présence de post-dépolarisation nécessite toujours une dépolarisation cellulaire au préalable.

On différencie deux types de post-dépolarisation : les post-dépolarisations précoces (EADs, *Early afterdepolarizations*) et les post-dépolarisations tardives (DADs, *Delayed afterdepolarizations*).

Les EADs apparaissent durant la phase plateau (à des valeurs de potentiel supérieures à -30 mV) ou au cours de la phase de repolarisation (**Figure 24A**). Elles sont générées à des fréquences cardiaques lentes et sont induites principalement par une réactivation des canaux à l'origine du courant I_{CaL} . Elles sont favorisées par l'allongement du PA, soit par une diminution des courants potassiques sortants repolarisants (I_{Ks} , I_{Kr}) ou soit par une augmentation des courants entrants sodiques et calciques (*Clusin, 2003; Hiraoka et al., 1992*).

Uniques ou répétitives, elles s'interrompent lorsque la repolarisation ramène le potentiel de membrane à un niveau plus électronégatif.

La naissance des EADs s'effectue préférentiellement dans les fibres de Purkinje ou dans la région du myocarde ventriculaire riche en cellules M dont les PAs sont les plus longs et les plus sensibles à la fréquence cardiaque.

Les EADs pourraient participer à la genèse d'arythmies cardiaques dans l'hypertrophie ventriculaire et l'insuffisance cardiaque, situation dans laquelle les PAs s'allongent à cause d'une diminution du courant I_K (*Long et al., 2015*). Une étude sur le VG hypertrophié de cœurs de lapins a pu montrer une amplification du phénomène de dispersion transmurale de la repolarisation à l'origine de la formation des EADs (*Yan and Antzelevitch, 1999*).

Ces post-dépolarisations apparaissent dans les tissus cardiaques exposés à des altérations électrolytiques, hypoxiques, du pH (*Adamantidis et al., 1986*) et à l'exposition de catécholamines (*Volders et al., 1997*).

Elles sont impliquées dans les mécanismes de TV polymorphes de type torsade de pointes et dans les syndromes de QT longs (*Levine et al., 1985*).

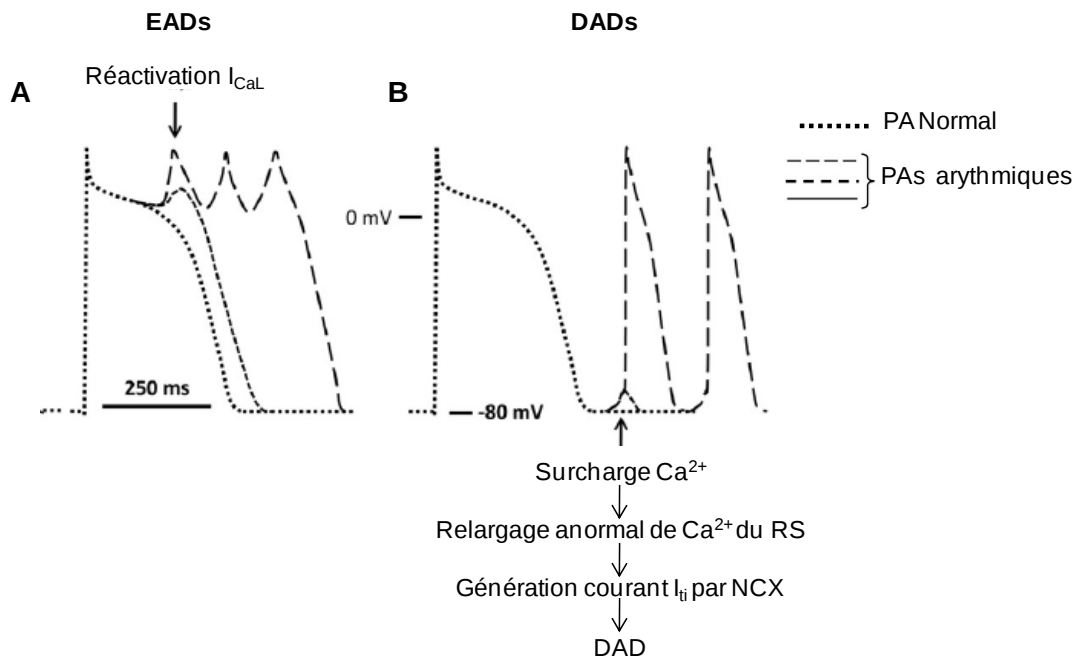


Figure 24. Représentation de post-dépolarisations précoces et tardives. Les EADs sont liées à une réactivation du courant I_{CaL} (A). Les DADs sont provoquées par une surcharge de Ca^{2+} dans le cytosol (B). Adapté d'(Iwasaki et al., 2011).

Les DADs sont des oscillations du potentiel de membrane qui apparaissent après la fin du processus de repolarisation (**Figure 24B**).

Les DADs ont été mises en évidence dans différents tissus cardiaques : myocarde auriculaire et ventriculaire, fibres de Purkinje.

Les conditions expérimentales et pathologiques (hypertrophie et insuffisance cardiaque) associées à une surcharge calcique peuvent provoquer des DADs. La surcharge calcique présente dans le cytoplasme des cardiomyocytes induit un courant transitoire entrant dépolarisant dépendant du Ca^{2+} (I_{ti}) (Clusin, 2003). Il s'agit d'un courant de nature sodique généré par l'échangeur NCX (entrée de trois ions Na^+ et sortie d'un ion Ca^{2+}). Le courant I_{ti} peut être également dû à un courant cationique non sélectif (I_{ns}) (Cannell and Lederer, 1986) ou plus rarement à un courant Cl^- dépendant du Ca^{2+} (Verkerk et al., 2001). Les agents pharmacologiques tels que la caféine ou la ryanodine affectent la libération et le stockage du Ca^{2+} dans le RS, favorisant la formation de DADs.

A l'inverse des EADs, les DADs sont induites par des fréquences rapides de stimulation et sont diminuées ou inhibées par les agents bloquants des canaux calciques de type L (Sung et al., 1983).

Les DADs sont à l'origine des arythmies par intoxication aux digitaliques (Ravens and Himmel, 1999), des arythmies dans la phase aiguë d'infarctus, des arythmies lors de la reperfusion et des TVs (Zipes et al., 1979).

c) Troubles de conduction et du rythme

Les tachycardies induites par un trouble de conduction répondent au mécanisme appelé réentrée. Deux conditions sont nécessaires à la constitution d'une réentrée : une zone de bloc unidirectionnel et une VC lente (**Figure 25**).

Le bloc unidirectionnel (BU) correspond à un bloc de la conduction dans une direction donnée, le long d'un groupe de fibres myocardiques alors que la conduction dans la direction opposée est préservée. La présence d'un BU est liée à l'hétérogénéité des périodes réfractaires des fibres voisines : certaines sont capables de conduire l'influx électrique à des dépolarisations prématurées alors que d'autres non. Il en résulte une conduction asymétrique en forme de boucle à travers laquelle le même influx peut à nouveau se propager et exciter les zones qu'il vient juste de traverser (*Spector, 2013*).

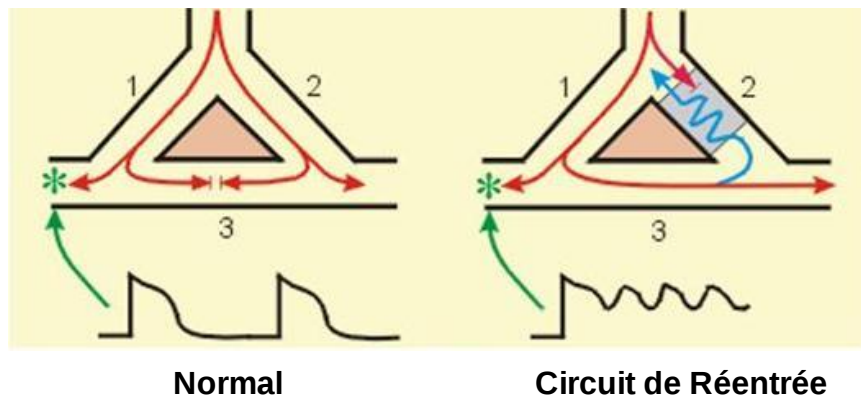


Figure 25. Modèle de réentrée dans les fibres de Purkinje. Dans les conditions normales, l'influx électrique se divise dans les branches de fibres de Purkinje (1,2). Si les deux branches convergent en une branche commune (3), l'influx électrique s'annule. Dans le cas d'une réentrée, le BU dans la branche 2 (zone en gris) empêche le passage de l'impulsion électrique antérograde mais non rétrograde. La branche 2 peut être activée à partir de l'influx électrique propagé dans les branches 1 et 3. Cet influx électrique qualifié de rétrograde traverse la zone de bloc à une vitesse lente. Si l'influx électrique sortant du BU (zone en gris) tombe sur un tissu excitable, alors la réentrée sera conduite dans la branche 1. Par contre si l'influx sort de la zone de bloc et rencontre un tissu inexcitable c'est-à-dire en période réfractaire effective, alors il sera supprimé. (*) correspond au positionnement de l'électrode d'enregistrement dans une branche latérale. Adapté du site internet <http://www.cvphysiology.com>.

Il existe deux types de réentrée que l'on peut séparer en réentrées anatomiques et fonctionnelles. Les différences entre ces deux types de réentrée résident dans l'existence ou non d'un circuit anatomique fixe et dans la relation entre la longueur d'onde et la taille du circuit. La longueur d'onde correspond à la distance parcourue par l'onde d'activation pendant un cycle cardiaque. Elle est égale au produit de la VC moyenne dans le circuit par la période réfractaire. Afin qu'une réentrée puisse être initiée et se maintenir, il faut que la longueur d'onde soit égale ou inférieure à la taille du circuit.

Les réentrées anatomiques ont un circuit fixe. Par exemple, dans le cas d'un infarctus du myocarde, la zone cicatricielle présente un fort ralentissement de la propagation de l'influx électrique. Ce ralentissement est la conséquence d'une désorganisation architecturale des fibres myocardiques envahies par une fibrose cicatricielle. Ces fibres myocardiques sont le siège d'une conduction lente de l'influx électrique qui laisse le temps au reste du myocarde structurellement sain de sortir de sa PRT pour être réactivé par le front ressortant de cette zone de conduction lente et ainsi favoriser la TV (*El-Sherif et al., 1977*). La longueur d'onde qui est courte dans ce contexte, permet une réentrée.

Les réentrées fonctionnelles ne disposent pas de circuit anatomique fixe. Elles apparaissent notamment lorsque les propriétés de repolarisation constituent un substrat au bloc de conduction unidirectionnel. La durée de la repolarisation détermine celle de la PRT. Le bloc de conduction ne peut survenir que si certains myocytes sont le siège d'une dépolarisation qui se propage c'est-à-dire sortis de leurs PRT, alors que d'autres myocytes sont encore en PRT créant ainsi une hétérogénéité spatiale des PRT. Dans de nombreuses situations pathologiques : TVs catécholaminergiques, insuffisance cardiaque, le lien entre la majoration de l'hétérogénéité de repolarisation et les réentrées a été démontré (*Akar and Rosenbaum, 2003*). De plus, la relation entre dispersion de repolarisation et bloc de conduction dans ces modèles pathologiques a pu être mise en évidence grâce à la cartographie d'activation de ces arythmies (*Akar et al., 2002*).

III/ Couplage Excitation-Contraction

1. Le sarcomère : structure élémentaire et fonctionnelle du cardiomyocyte

Le sarcomère est l'unité contractile des muscles striés squelettique et cardiaque. Au sein des cardiomyocytes, le sarcomère se répète sur la totalité de la cellule. Il est limité par deux bandes transverses appelées stries Z. Chaque sarcomère est composé de myofilaments épais de myosine et de myofilaments fins d'actine dont la disposition est responsable de l'aspect en bandes observé en microscopie électronique (**Figure 26**).

En effet, le sarcomère est composé d'une bande sombre A dite anisotrope à la lumière polarisée et de deux demi-bandes claires I dites isotropes qui sont reliées par les stries Z. Les bandes I sont composées de myofilaments fins d'actine alors que les bandes A sont formées

INTRODUCTION

des deux types de myofilaments. Cependant, dans le sarcomère au repos, au milieu de la bande A, il existe une zone de projection plus ou moins claire qualifiée de bande H qui est essentiellement composée de myofilaments épais de myosine. Au cours de la contraction, la bande H comporte les deux types de myofilaments. Au centre de cette bande H, se trouve la ligne M composée de la myoméline et de sites de fixation à la titine, séparant le sarcomère en deux parties égales.

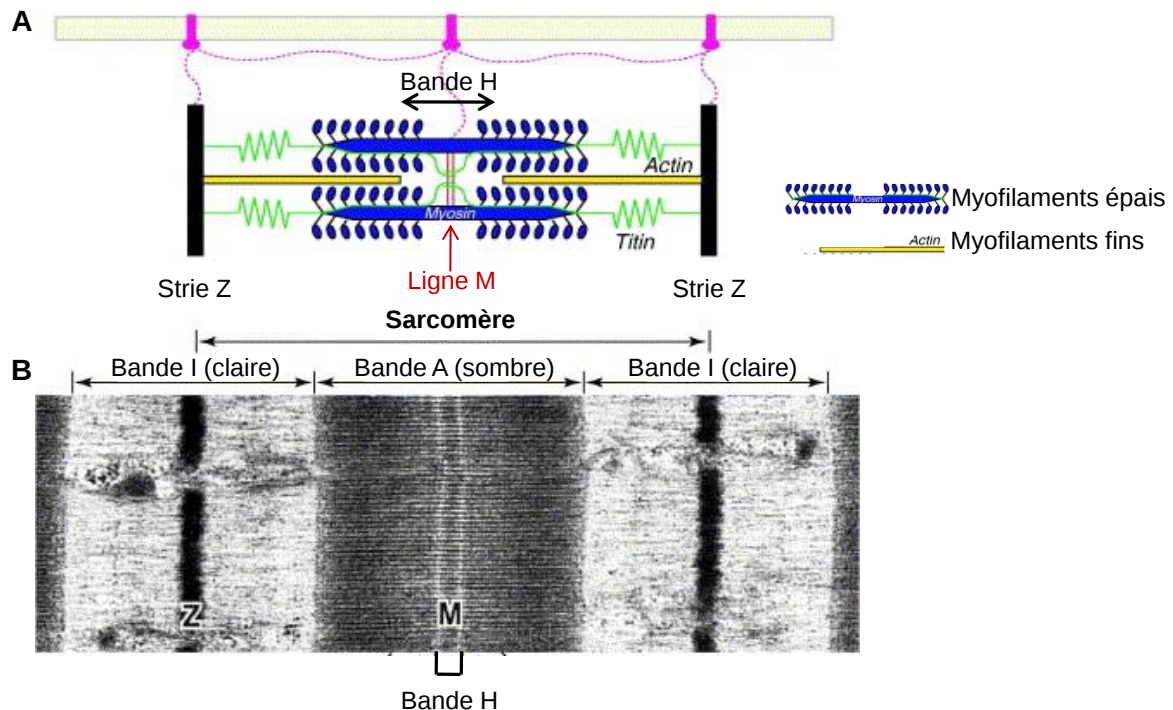


Figure 26. Organisation structurale du sarcomère. L'association de filaments fins d'actine, de filaments épais de myosine et de filaments élastiques de titine constitue le sarcomère, structure contractile des cardiomyocytes délimitée par deux bandes Z. Les filaments extra sarcomériques (magenta) assurent l'ancrage de ces différents éléments à la membrane plasmique de la cellule (A). L'observation au microscope électronique montre l'alternance de bandes claires (I) isotropes et sombres (A) anisotropes. La strie Z divise la bande I en deux parties égales. La bande H au centre de la bande A est traversée par la ligne M dense aux électrons (B). Adapté d'(Agarkova and Perriard, 2005).

Les filaments fins mesurent 7 nm de large et 1 μm de long, et sont ancrés à la strie Z par leurs extrémités positives. Ils sont formés de trois composantes protéiques différentes : l'actine, la tropomyosine et le complexe des troponines (TnC, TnI, TnT) (Figure 27).

Les filaments d'actine s'étendent de la ligne Z jusqu'au bord de la bande H, et sont représentés par deux chaînes hélicoïdales qui s'entrecroisent. Ces chaînes sont constituées de monomères d'actine globulaire (actine G) qui se polymérisent pour former l'actine filamenteuse (actine F).

La tropomyosine est une protéine hétérodimérique formée de deux chaînes polypeptidiques α et β qui s'enroulent entre elles sous forme d'hélice α . Cette protéine filamenteuse suit de manière longitudinale le filament d'actine F en se logeant dans l'espace situé entre les deux chaînes du filament d'actine F.

La tropomyosine permet de stabiliser les filaments d'actine en s'enroulant autour d'eux en spirale. A l'état de repos, les molécules de tropomyosine reposent sur les sites actifs des brins d'actine empêchant ainsi l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine et par conséquent la contraction.

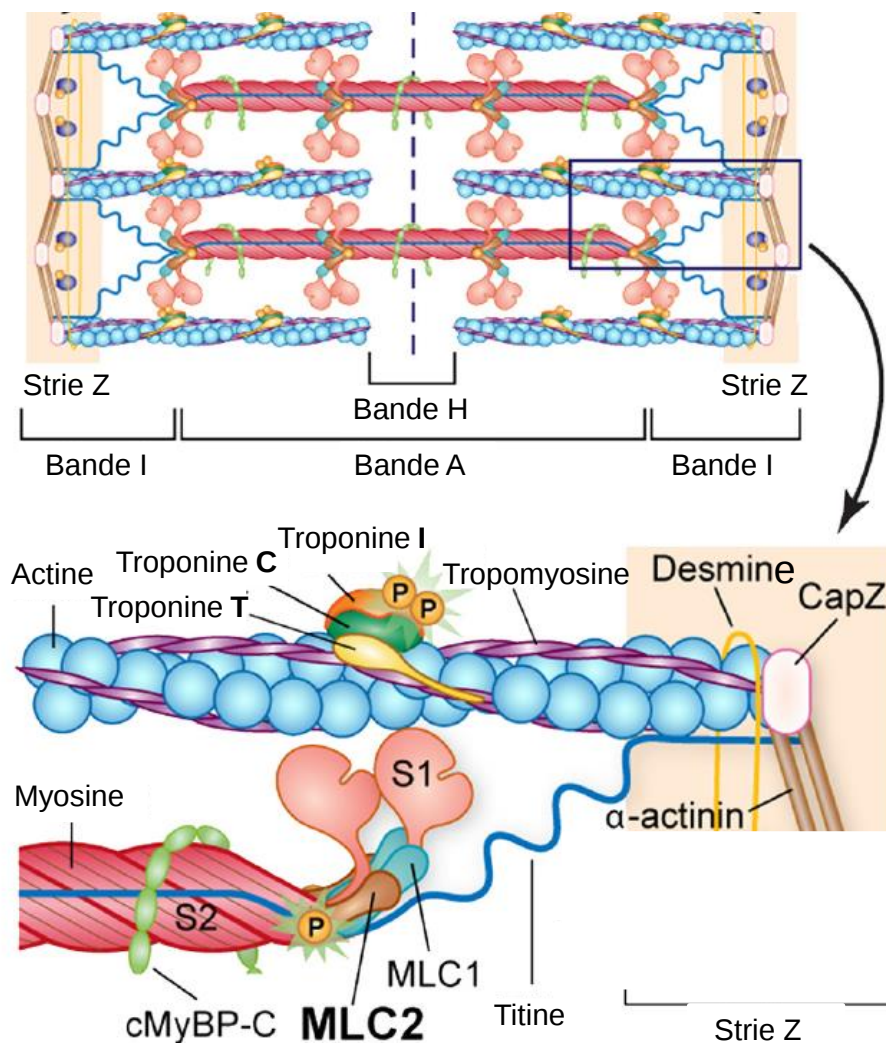


Figure 27. Principales protéines constitutives des myofilaments. Représentation schématique de l'organisation spatiale des myofilaments épais et fins au sein des sarcomères. Adapté de (Peng et al., 2014).

Le complexe des trois sous-unités de troponine sont reliées entre elles. Elles possèdent chacune un rôle permettant d'assurer une régulation fine du processus de contraction. La troponine I (TnI) possède une grande affinité pour l'actine et inhibe la contraction. En effet, elle empêche la fixation de l'actine sur la myosine et donc la formation

INTRODUCTION

du complexe actomyosine. En absence de Ca^{2+} , la TnI inhibe l'effet activateur de l'actine sur l'activité ATPasique de la myosine, en masquant le site d'association de l'actine avec la myosine. La troponine T (TnT) permet la liaison de la troponine à la tropomyosine. En se fixant sur la tropomyosine, la TnT permet de fixer le complexe des troponines le long du filament fin d'actine. Par ailleurs, la TnT fixe la TnI et la troponine C (TnC). La TnI masque le site de fixation de la myosine sur l'actine, inhibant ainsi l'effet activateur de l'actine sur l'activité ATPasique de la myosine. La TnC est formée de deux parties globulaires N et C terminales séparées par une longue chaîne d'hélice α . La partie C terminale fixe les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} avec une forte affinité. Ceci favorise l'interaction TnC-TnI ainsi que la fixation de la TnC sur le filament fin d'actine. La partie N terminale fixe le Ca^{2+} . Lorsque la TnC est saturée en Ca^{2+} , l'effet inhibiteur de la TnI est levé.

Les filaments épais du sarcomère ont un calibre de 15 nm et une longueur de 1,5 μm . Ils sont principalement formés d'une association de 300 à 400 molécules de myosine. La myosine est une protéine possédant une structure hexamérique, constituée de deux chaînes lourdes identiques (MHC, *Muscle heavy chain*), de deux paires de chaînes légères (MLC, *Muscle light chain*) et de deux chaînes régulatrices.

Les MHC sont des protéines d'un poids moléculaire d'environ 200 kDa. Il existe deux isoformes, MHC α et MHC β qui sont exprimés en fonction du territoire cardiaque, du stade de développement et de l'espèce étudiée (Everett, 1986; Kuro-o et al., 1986). En effet, l'isoforme MHC α est principalement exprimé chez le petit animal alors que MHC β représente l'isoforme prédominant chez l'Homme. Ces chaînes lourdes sont formées d'une partie filamenteuse (tige), d'un cou et d'une partie globulaire (tête) qui porte l'activité enzymatique ATPasique de la molécule (**Figure 28**). L'hydrolyse des molécules d'ATP au niveau de la tête fournit l'énergie nécessaire pour la formation des complexes actomyosines. Les associations entre deux MHC α ou entre deux MHC β ont été rapportées dans plusieurs régions du cœur. Elles montrent des activités enzymatiques différentes, régulant ainsi la vitesse de la contraction (Locher et al., 2009). MHC α possède une plus forte activité ATPasique que MHC β .

Les MLC sont de natures multiples et leurs poids moléculaire varient entre 17 et 26 kDa. Les chaînes légères de myosine 1 et 2 (MLC-1 et MLC-2) sont respectivement considérées comme étant essentielle et régulatrice dans la formation du complexe actomyosine de l'appareil contractile des cardiomyocytes (Lyons et al., 1990). Elles sont exprimées en fonction des territoires cardiaques et de l'âge (Kurabayashi et al., 1988). En effet, on retrouve

les isoformes MLC-1v et -2v principalement au niveau des ventricules et les isoformes MLC-1a et -2a au niveau des oreillettes (Lyons *et al.*, 1990). Les différents types de MLC cardiaques sont sensibles au Ca^{2+} . Le rôle des chaînes régulatrices est de moduler l'activité ATPasique des têtes des chaînes MHC (Morano, 1999). La phosphorylation de MLC par certains types de sérine thréonine kinases semble avoir un effet positif sur le rôle modulateur de l'activité ATPasique de MHC (Winegrad, 2005) (**Figure 28**).

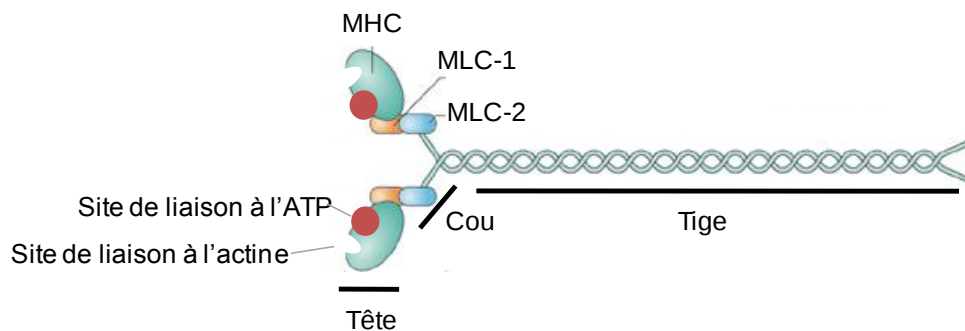


Figure 28. Composition de la protéine de myosine. La myosine se divise en trois segments : la tête globulaire, le cou et la tige. La tête globulaire possède des sites de liaison à l'actine et à l'ATP. Adapté (Vicente-Manzanares *et al.*, 2009).

Sur le plan architectural, les filaments épais sont construits de manière bipolaire, ce qui signifie que toutes les têtes d'une moitié de filament sont orientées de la même manière et contraire à l'orientation des têtes de l'autre moitié. Le corps du filament épais est formé de l'agencement des tiges de myosine alors que les têtes se fixent à l'extérieur des tiges. A la hauteur de la ligne M, les têtes font défaut et les queues des molécules des deux moitiés se mélangent.

Plusieurs protéines associées aux myofilaments épais de myosine et fins d'actine interviennent dans la composition et l'organisation du sarcomère. On retrouve la titine ou encore appelée connectine qui est une grosse protéine (environ 3 MDa) sur toute la longueur du sarcomère. La titine possède en son centre un motif formé de la répétition de la séquence d'acides aminés PEVK (proline, glutamate, valine, lysine) qui agit comme un ressort en ramenant le muscle qui vient d'être étiré à sa forme originale (Trinick, 1996). Il existe deux isoformes cardiaques : l'isoforme N2BA et l'isoforme N2B. On retrouve ces deux isoformes dans le myocarde de nombreux mammifères à l'exception du rat par exemple qui ne présente que la forme N2B (Cazorla *et al.*, 2000). Les extrémités de la molécule de titine sont fixées de la ligne M jusqu'aux stries Z grâce à l' α actinine. Cette protéine s'étend donc le long des myofilaments épais de myosine auxquels elle est liée par l'intermédiaire de la protéine C liant la myosine (MyBP-C, Cardiac myosin-binding protein) (**Figure 27**). La titine empêche

INTRODUCTION

l'hyperextension du sarcomère et assure le rétablissement de ce dernier dans sa structure originelle une fois la contraction interrompue. Quand les myofibrilles sont étirées au-delà de la zone de raccourcissement des filaments fins et épais, la titine génère passivement une tension. La protéine C (MyBP-C) est une autre protéine associée aux myofilaments épais de myosine, elle est localisée majoritairement au niveau de la bande H. Elle relie la myosine à l'actine, tout en servant de molécule d'ancrage pour la titine. La protéine M ou myoméline est une protéine présente au niveau de la bande H, et permet de maintenir les myosines entre elles au niveau de la ligne M.

2. Bases structurales du couplage excitation-contraction

Le couplage excitation-contraction (CEC) représente l'ensemble des phénomènes par lequel l'excitation électrique du cardiomyocyte induit une contraction musculaire (Bers, 2002). Ce phénomène de CEC s'effectue grâce à une organisation subcellulaire appelée dyade (Scriven *et al.*, 2013). Chaque dyade est formée de la juxtaposition de deux structures membranaires : les tubules transverses (tubule T) et les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique (RS) jonctionnel (**Figure 29**).

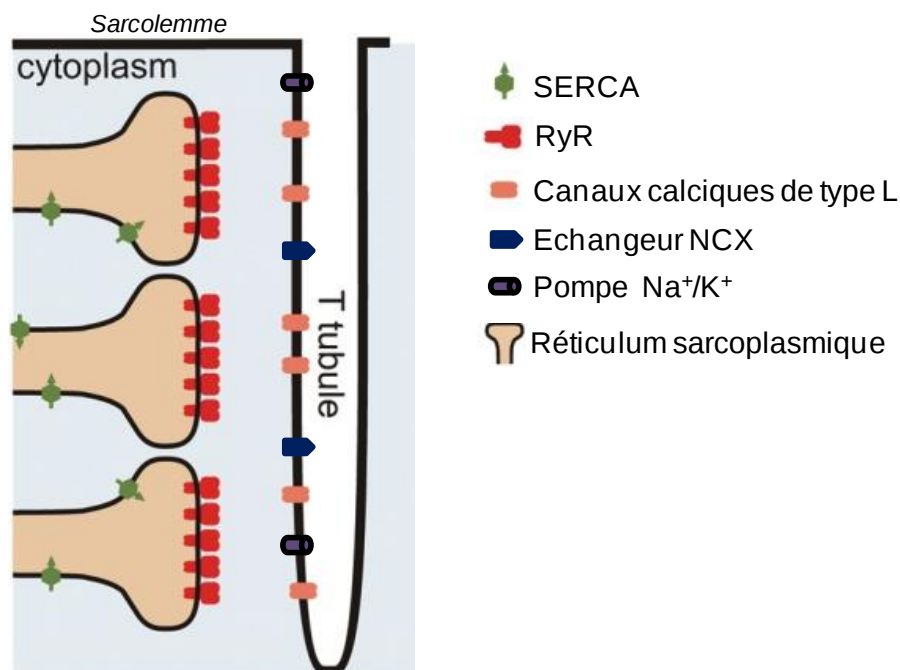


Figure 29. Représentation schématique d'une dyade. La dyade est formée de zones de rapprochement étroites entre les tubules T et le RS. Les canaux calciques de type L ou DHPRs, l'échangeur NCX ainsi que les pompes Na⁺/K⁺ sont localisés préférentiellement au sein des tubules T. Les récepteurs à la ryanodine (RyRs) font face aux DHPRs favorisant le CEC. *Adapté de (Polakova and Sobie, 2013).*

a) Les tubules transverses

Les tubules T correspondent à des invaginations transversales de la membrane cellulaire ou sarcolemme des cardiomyocytes. Ils sont en majorité présents au niveau de la membrane des myocytes ventriculaires des mammifères où ils représentent environ 30% de la surface membranaire avec un diamètre compris entre 100 et 300 nm (*Brette and Orchard, 2003*). Ils sont peu représentés au niveau des cardiomyocytes auriculaires où ils occupent uniquement 15% de la surface membranaire. Dans les cellules cardiaques des oreillettes, les tubules T sont préférentiellement présents chez les grands mammifères et l'Homme (*Richards et al., 2011*). Ils sont absents au niveau des cellules sinusales et cardionectrices (*Ayettey and Navaratnam, 1978*).

La répartition des tubules T est régulière au sein du sarcolemme, formant ainsi un réseau continu et ramifié au sein du myocyte. Ils sont localisés au niveau des stries Z des sarcomères. Inexistant à la naissance, les tubules T apparaissent au cours du développement et nécessitent la présence de différents éléments tels que le cholestérol et des protéines spécifiques comme les cavéolines de type 3 et les amphiphysines de type 2 (*Carozzi et al., 2000*). Chez le rat les tubules T sont absents à la naissance et apparaissent uniquement à partir du 20^{ème} jour postnatal (*Ziman et al., 2010*).

Il s'agit d'une structure labile qui peut disparaître lors de pathologies cardiaques (cardiomyopathie dilatée, insuffisance cardiaque) altérant ainsi le phénomène de CEC (*Balijepalli et al., 2003*). On peut observer également entre les tubules T, la présence de saccules ou tubules longitudinaux qui servent de réservoirs pour les ions Ca^{2+} intracellulaires (*Soeller and Cannell, 1999*). Les proportions de ces différentes structures dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat sont de 60% pour les tubules T et de 40% pour les tubules longitudinaux.

Le rôle des tubules T permet d'assurer le rapprochement physique des DHPRs et des RyRs afin d'assurer la conduction de l'onde de dépolarisation du PA à l'intérieur de la cellule participant au CEC. Pour assurer cette fonction, plusieurs canaux ioniques, échangeurs et transporteurs sont localisés au niveau des tubules T (**Figure 29**). En effet, on retrouve principalement les canaux responsables du courant I_{CaL} ou DHPRs, les échangeurs NCX ainsi que les pompes Na^+/K^+ . La distribution membranaire des courants ioniques au sein des tubules T est de 80% pour le courant I_{CaL} , 63 % pour le courant I_{NCX} , et 59% pour le courant $\text{I}_{\text{Na/K}}$ dans les cardiomyocytes de rat (*Brette and Orchard, 2007*). On dénote également au

INTRODUCTION

niveau des tubules T, la présence d'isoformes neuronaux des canaux sodiques ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.6$) (*Brette and Orchard, 2006; Maier et al., 2002*). Des études expérimentales sur des myocytes ventriculaires de rat ont révélé la présence de courants I_{to} , I_K et I_{K1} en faible proportion au sein des tubules T (*Komukai et al., 2002*).

b) Le réticulum sarcoplasmique

Le RS est un organite intracellulaire spécialisé dans le stockage et la libération du calcium responsable de la contraction du sarcomère. Ce réseau de membrane intracellulaire intercalé entre les myofibrilles cardiaques est composé de deux régions : le RS longitudinal et le RS jonctionnel. Le RS jonctionnel correspond aux extrémités du réseau qui forment des renflements nommés citernes terminales, apposées à la membrane des tubules T. Il permet le stockage et la libération de Ca^{2+} grâce à des récepteurs spécifiques, les récepteurs à la ryanodine (RyRs, *Ryanodine receptor*). Le RS longitudinal est un réseau fin disposé entre les sarcomères parallèlement aux cardiomyocytes reliant les citernes terminales. Il est spécialisé dans la recapture du Ca^{2+} grâce à une pompe Ca^{2+} ATPasique (SERCA, *Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase*).

Les RyRs sont des canaux calciques dont le nom provient de leur capacité à lier la ryanodine qui est un alcaloïde végétal extrait de *Ryana Speciosa*. Il s'agit d'une protéine de haut poids moléculaire (>500 kDa), homotétramérique ancrée dans la membrane du RS jonctionnel.

Les RyRs font partie d'une famille de trois isoformes RyR1, 2 et 3 codés par des gènes distincts et exprimés dans des tissus différents. RyR1 est présent dans le muscle squelettique et peut être retrouvé dans le muscle cardiaque avec un faible niveau d'expression (*Coronado et al., 1994; Neylon et al., 1995*). RyR2 est la forme prédominante dans le muscle cardiaque. On le retrouve également dans le muscle lisse et dans des régions du cerveau (cervelet, cortex cérébral) (*Furuichi et al., 1994*). RyR3 est exprimé à faible niveau dans divers tissus comme le muscle squelettique en développement, le cerveau, certaines CMLs, et cellules non musculaire (*Tarroni et al., 1997*). L'isoforme RyR3 est présent au niveau des cellules de Purkinje (*Stuyvers et al., 2005*).

Au sein de la dyade, les RyR2 ne présentent pas de couplage mécanique direct avec les DHPRs, ils sont néanmoins très proches les uns des autres (séparation de 12 nm environ) afin d'optimiser la libération de Ca^{2+} (*Protasi, 2002*). Les RyR2 sont regroupés en « cluster » au

sein du RS jonctionnel avec 1 DHPR pour 5-10 RyR2 suivant l'espèce (*Bers and Stiffel, 1993; Sun et al., 1995*).

Les RyR2 possèdent une extrémité C-terminale cytoplasmique formant le pore du canal et une extrémité N-terminale également cytoplasmique assurant la liaison avec des facteurs régulateurs (*Fill and Copello, 2002*). Ces facteurs régulateurs sont la calstabine 2 ou le FKBP12.6, la calmoduline, des protéines kinases ainsi que des phosphatases (**Figure 30**).

La calstabine 2 ou le FKBP12.6 est une protéine qui se fixe sur chaque monomère de la protéine RyR2 permettant de maintenir le canal dans son état fermé (*Brillantes et al., 1994*). A l'inverse, la dissociation du complexe FKBP12.6-RyR2 augmente la probabilité d'ouverture du canal.

La calmoduline (CaM) est une protéine qui possède quatre domaines « EF hands » de liaison du Ca^{2+} .

L'activité de RyR2 est dépendante également de l'état de phosphorylation du canal et de ses partenaires régulateurs grâce à l'action de protéines kinases et de phosphatases. Les protéines kinases telles que la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase II dépendante de la calmoduline (CamKII) sont capables de phosphoryler RyR2. Dans le cas de la phosphorylation de RyR2 par la PKA, la protéine FKBP12.6 se détache de RyR2 favorisant ainsi l'activation du canal. En condition pathologique, par exemple lors de l'insuffisance cardiaque, un processus d'hyperphosphorylation de RyR2 par la PKA est observé (*Marx et al., 2000*). Le canal peut être phosphorylé par la CamKII mais son effet activateur semble moins important que celui de la PKA (*Witcher et al., 1991*). Cette phosphorylation est indépendante de l'interaction FKBP12.6-RyR2.

Les phosphatases dont le rôle est de déphosphoryler le canal RyR2, sont de deux types : la phosphatase 1 (PP1) et la phosphatase 2A (PP2A).

Le calcium est un facteur important, régulant l'ouverture et la fermeture de RyR2 (*Rousseau and Meissner, 1989*). Le canal RyR2 possède deux sites de fixations cytosoliques pour le Ca^{2+} . Le premier site de fixation est un site à haute affinité pour le Ca^{2+} (Ca-Activation). Il est responsable de l'activation et de l'ouverture du canal pour de faibles concentrations en Ca^{2+} cytosolique (à partir de 100 nM), avec une activité maximale pour les concentrations de 1 à 10 μM . Le second site de fixation possède une plus faible affinité pour le Ca^{2+} (Ca-Inactivation), et il provoque l'inactivation du canal pour des concentrations en Ca^{2+} cytosolique élevées de l'ordre de 1 à 10 mM (*Copello et al., 1997*) (**Figure 30**).

INTRODUCTION

Le canal RyR2 est sensible à la concentration de Ca^{2+} luminale du RS (*Ching et al., 2000*). En effet, on observe une inactivation du canal lorsque la concentration en Ca^{2+} luminale du RS atteint une valeur seuil basse. Ce mécanisme permet de maintenir le canal RyR2 inactif en diastole laissant le temps au stock calcique du RS de se reconstituer (1 mM de Ca^{2+}). A l'inverse, lorsque le RS est surchargé en Ca^{2+} , le canal RyR2 va jouer le rôle de soupape calcique en laissant échapper du Ca^{2+} vers le cytosol.

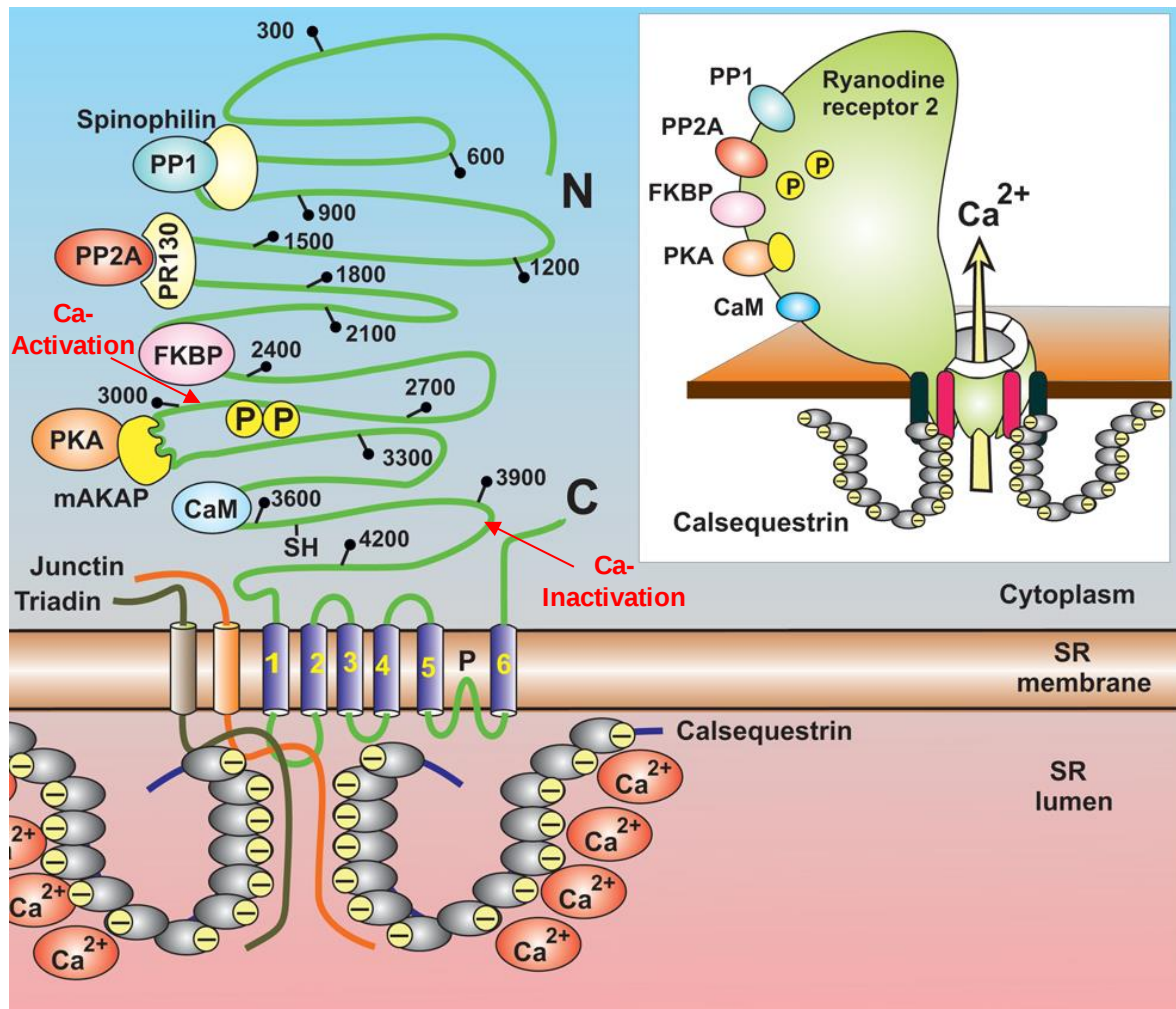


Figure 30. Domaines fonctionnels de RyR2. La protéine RyR2 est une protéine homotétramérique. Chaque monomère possède des extrémités C-terminale et N-terminale cytoplasmiques. L'extrémité C-terminale constitue le pore du canal et l'extrémité N-terminale permet la liaison aux facteurs régulateurs de l'activité de RyR2. La liaison des phosphatases PP1 et PP2A à RyR2 s'effectue par l'intermédiaire de la spinophilin et de la PR130 (en jaune). La PKA se lie à l'extrémité N-terminale de RyR2 grâce à la protéine mAKAP. Les protéines CaM et FKBP12.6 sont également représentées. Les résidus sérine cibles de la PKA (résidu 2808) et CamKII (résidu 2814) sont représentés par le signe P en jaune. Les sites de haute (Ca-Activation) et de faible (Ca-Inactivation) affinité de fixation du Ca^{2+} sont représentés en rouge sur la protéine RyR2. Adapté du site internet <http://www.cellsignallingbiology.org>.

La SERCA est une pompe calcique ATPasique de 100 kDa existant sous douze isoformes. SERCA2a est le principal isoforme exprimé dans le muscle cardiaque. Cette pompe est localisée sur la membrane du RS longitudinal. Elle assure le transport actif de deux

ions Ca^{2+} du cytosol vers la lumière du RS en hydrolysant une molécule d'ATP en ADP et P_i . L'activité de cette pompe est régulée par une protéine associée, le phospholamban (PLB). Lorsque le PLB est déphosphorylé, il se lie au domaine cytoplasmique de SERCA et inhibe ainsi l'activité ATPasique de la pompe (Colyer, 1998). La phosphorylation du PLB par la PKA et la CamKII permet de lever l'inhibition du PLB sur la pompe SERCA2a.

3. Dynamique

Lors d'un PA, l'influx électrique se propage le long du sarcolemme des cardiomyocytes induisant l'activation des DHPRs. Au niveau des tubules T, l'activation des DHPRs permet une entrée modérée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Cette augmentation locale de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} (*calcium induced*) au sein de la dyade provoque une activation des RyR2 du RS jonctionnel en regard des DHPRs. L'ouverture des canaux RyR2 permet une libération massive du Ca^{2+} issue du RS jonctionnel (*calcium release*). On parle du phénomène *Calcium induced calcium release* (**Figure 31**). L'ouverture de chaque RyR permet le relargage d'une petite quantité de Ca^{2+} qualifié d' « étincelles calciques » ou *sparks*. Donc, l'onde calcique intracellulaire massive survenant lors du phénomène de CICR résulte de la sommation des étincelles calciques liée à l'activation simultanée d'un grand nombre de RyRs. La concentration du Ca^{2+} cytoplasmique augmente d'un facteur 10, passant de moins de 100 nM à 1 μM environ (Bers, 2001).

Les ions Ca^{2+} libérés dans le cytoplasme vont se lier à la TnC induisant un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine (**Figure 32**). Ces changements conformationnels aboutissent à la libération des sites de fixation de la myosine à l'actine. Les têtes de myosine hydrolysent une molécule d'ATP et se replient pour se rapprocher de leur site de fixation à l'actine. La tête de myosine ne libère que l'ADP et le P_i une fois la formation du complexe actomyosine établie. Cette libération d'ADP et P_i permet aux têtes de myosine de se replier complètement provoquant le glissement des myofilaments épais par rapport aux myofilaments fins et donc un raccourcissement des sarcomères. La réduction de la longueur des sarcomères au sein des cardiomyocytes associée à leurs synchronisations génèrent une contraction. Le complexe actomyosine se dissocie lors de la fixation d'une nouvelle molécule d'ATP.

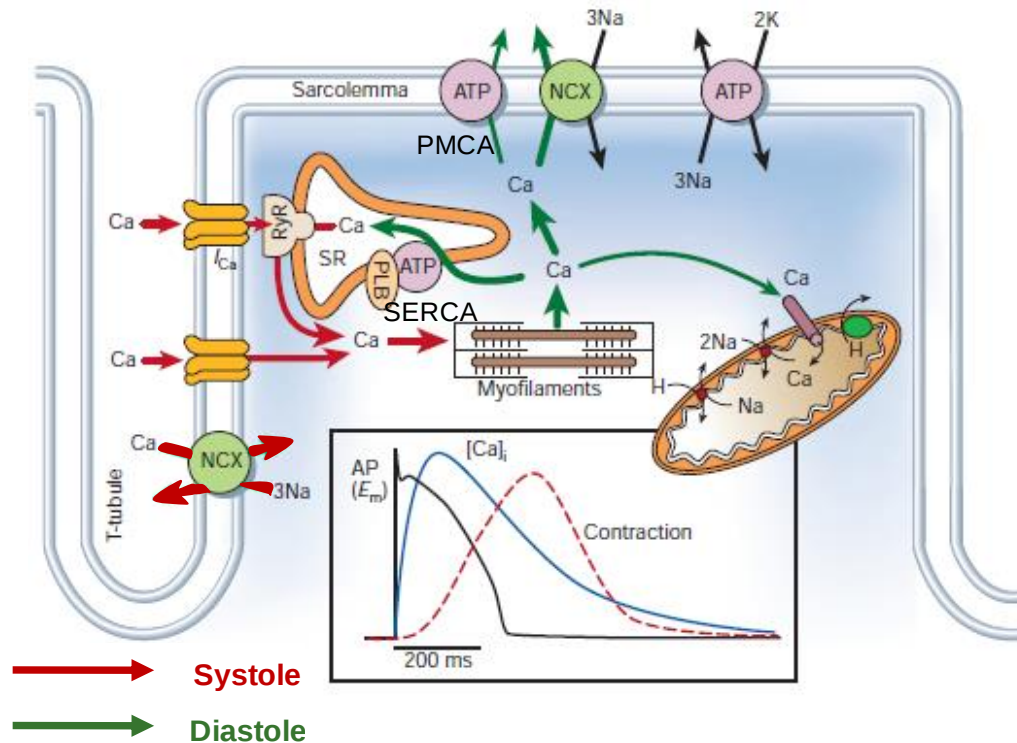


Figure 31. Couplage excitation-contraction de cardiomyocytes ventriculaires. Représentation schématique du transport de Ca^{2+} dans les myocytes ventriculaires lors du CEC. Durant la systole (flèche rouge), la dépolarisation des tubules T active les canaux calciques de type L générant l'entrée de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Cette entrée d'ions calciques va alors permettre la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires en activant les RyR2 du RS. NCX permet également une entrée de Ca^{2+} dans la cellule. La fixation du Ca^{2+} entraîne un changement conformationnel de la TnC. Celle-ci va alors ponter les myofilaments d'actine et de myosine, mécanisme conduisant à la contraction musculaire. Lors de la diastole (flèche verte), le Ca^{2+} est pompé du cytosol vers le RS à travers la pompe SERCA2a régulée par le PLB. Le Ca^{2+} est également expulsé de la cellule grâce à l'échangeur NCX et la pompe PMCA. La mitochondrie joue un rôle mineur lors de la diastole en stockant le Ca^{2+} cytosolique via l'uniport calcique. *Adapté de (Bers, 2002).*

Outre la dissociation du Ca^{2+} de la TnC, la phase de relaxation nécessite la diminution de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire à une valeur approximative de 100 nM. Le sarcolemme et deux organites cellulaires : le RS et les mitochondries peuvent assurer ce rôle.

Lors de la diastole, la majorité du Ca^{2+} cytosolique est repompé vers le RS par l'intermédiaire de la pompe SERCA2a. Par exemple, dans les cardiomyocytes ventriculaires de rat, le RS repompe environ 87% du Ca^{2+} cytosolique contre 75% dans les cellules ventriculaires de lapin (Negretti et al., 1993). L'échangeur NCX présent au niveau du sarcolemme et plus particulièrement au niveau des tubules T assure l'extrusion d'une molécule de Ca^{2+} contre l'entrée de trois ions Na^+ . Des études expérimentales sur des myocytes ventriculaires de lapin ont montré que dans le cas d'une inhibition des pompes SERCA2a, NCX serait responsable de l'extrusion de 95% du Ca^{2+} cytosolique (Bassani et al., 1992). La pompe Ca^{2+} ATPasique (PMCA, Plasma membrane Ca^{2+} ATPase) présente au niveau du sarcolemme assure

également la sortie des ions Ca^{2+} contre l'hydrolyse de molécule d'ATP. La mitochondrie participe faiblement au phénomène de relaxation grâce à l'uniport calcique mitochondrial (MCU, *Mitochondrial calcium uniporter*) permettant le restockage du Ca^{2+} cytosolique.

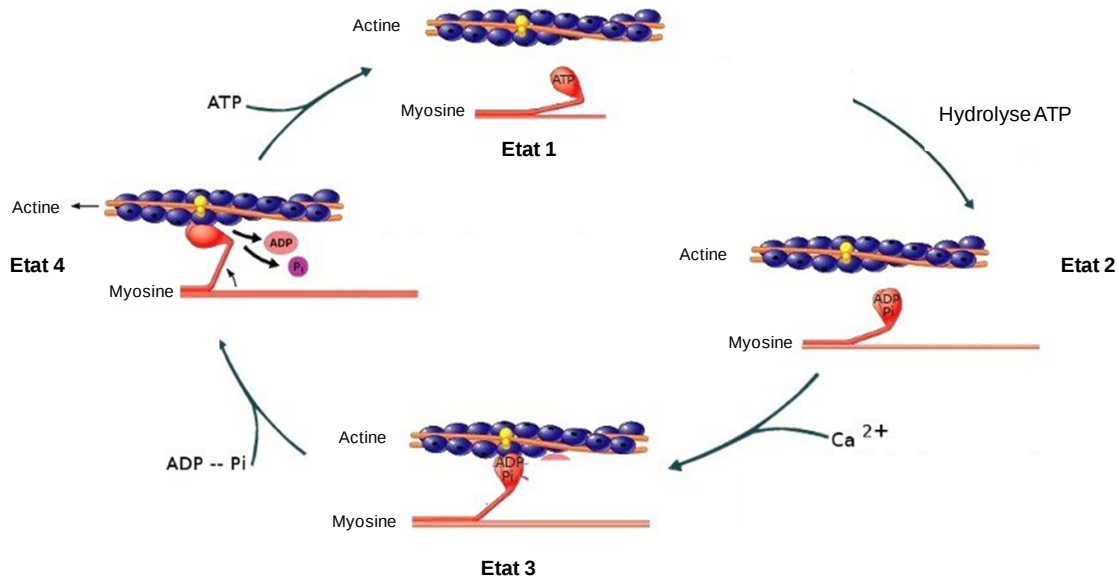


Figure 32. Cycle de la contraction musculaire. Le cycle biochimique de la contraction musculaire peut se définir comme un attachement cyclique de la tête de myosine sur le filament d'actine. Au repos une molécule d'ATP est fixée sur la tête de myosine ce qui a pour effet de dissocier la tête de myosine de l'actine (état 1). La tête de myosine hydrolyse l'ATP en ADP et P_i induisant un changement de conformation de la tête de myosine qui se retrouve perpendiculaire à l'axe du filament de myosine (état 2). L'augmentation de Ca^{2+} intracellulaire permet à la troponine de déplacer la tropomyosine et de libérer les sites de liaison de l'actine à la myosine. On assiste ainsi à la création de ponts transversaux actomyosine (état 3). L'association des deux protéines myofibrillaires provoque la libération de l'ADP et un changement de conformation de la tête de myosine qui prend une inclinaison de 45° par rapport au filament de myosine. Le myofilament d'actine se déplace vers le centre du sarcomère (état 4).

IV/ Pathologies arythmogènes du ventricule droit

1. Tachycardie ventriculaire idiopathique

La tachycardie ventriculaire idiopathique (TVI) est une pathologie bénigne qui survient chez des patients sans cardiopathies sous-jacentes. Elles représentent 10% des TVs avec un faible risque de mort subite. Les TVIs peuvent survenir dans diverses régions du VD ou du VG. Au niveau du VD, elles se manifestent le plus souvent au niveau de l'infundibulum pulmonaire et plus particulièrement au niveau de l'endocarde ; de la paroi libre et/ou proche de la valvule tricuspide. Concernant le VG, les TVIs se déclarent plus rarement au niveau de la chambre de chasse (sub-épicaire ou sub-endocarde près de la valve aortique) ou au niveau fasciculaire (postéro-latéral, antéro-supérieur ou fasciculaire septal haut) (*Park et al., 2012*).

a) Les tachycardies ventriculaires idiopathiques infundibulaires

Les TVIs infundibulaires constituent 75 à 90% des TVIs. Elles furent décrites pour la première fois en 1922 par Gallavardin sous forme d'extrasystoles ventriculaires (ESV). Ce type de TVI se divise en deux sous-groupes :

- la TVI monomorphe (un seul foyer ectopique) en salves non soutenues répétées, décrivant un aspect électrocardiographique où plusieurs battements ectopiques d'origine ventriculaire s'enchaînent sans interposition du rythme sinusal (*Buxton et al., 1983*). Les TVIs infundibulaires monomorphiques non soutenues se manifestent généralement vers l'âge de 30-50 ans avec un ratio homme/femme égal à un. Les symptômes sont variables, environ 73% des patients sont symptomatiques (palpitations, syncope) (*Altemose and Buxton, 1999*).
- la TVI soutenue paroxystique moins fréquente survenant en général à l'effort ou lors d'un stress émotionnel.

Les patients ayant une TVI infundibulaire présentent un ECG avec une morphologie de bloc de branche gauche (BBG).

Elles sont dues à la formation de DADs utilisant comme médiateur l'AMPc, associé à une hypersensibilité aux catécholamines (*Lerman, 1993; Lerman et al., 1986*). En effet, la fixation des catécholamines sur les récepteurs adrénergiques favorisent l'augmentation de l'AMPc et la cascade de signalisation cellulaire aboutissant à une fuite calcique du RS et par conséquent à une surcharge de Ca^{2+} intracellulaire à l'origine de DADs.

Ces TVI infundibulaires peuvent disparaître parfois après l'injection d'adénosine dont l'action médiée par la guanosine monophosphate s'oppose à celle médiée par l'AMPc.

Le bilan échographique de patients avec une TVI infundibulaire est normal à 90%. Les examens IRM permettent quant à eux, la détection d'anomalies structurales localisées telle qu'une diminution de l'épaississement de la paroi myocardique du VD en systole (*Carlson et al., 1994*).

Le traitement va dépendre de la fréquence et de la sévérité des symptômes. Par exemple, les patients asymptomatiques sont suivis mais ne subissent aucune intervention thérapeutique. A la différence, pour des patients symptomatiques, un traitement pharmacologique s'avère nécessaire. Il est basé sur l'administration de bêta bloquants ou de bloqueurs des canaux calciques (vérapamil) dans 25-50 % des cas (*Mont et al., 1991; Taylor and Halliday, 1965*).

Pour les patients ne répondant pas au traitement, une ablation par radiofréquence du foyer arythmogène peut être envisagée. Le succès de l'ablation des TVIs infundibulaires a été rapporté dans 83-100% des cas (*Globits et al., 1997; Joshi and Wilber, 2005*).

b) Les tachycardies ventriculaires idiopathiques fasciculaires

Les TVIs fasciculaires ou de Belhassen du VG (10% des TVIs) représentent un trouble du rythme naissant vraisemblablement en dessous de la bifurcation des faisceaux de His. Zipes et son équipe furent les premiers à identifier les caractéristiques électrophysiologiques des TVIs fasciculaires. Elles sont connues pour leur sensibilité à un inhibiteur des canaux calciques, le vérapamil (*Belhassen et al., 1981*).

Elles se manifestent chez des patients jeunes entre 10 et 50 ans avec une prédominance chez les sujets masculins. Les symptômes sont variables : fatigue, dyspnée, vertiges. Les épisodes de syncopes ainsi que la mort subite sont plutôt rares. Les TVIs fasciculaires sont souvent provoquées par un effort.

Sur le versant électrique, l'ECG est normal dans la majorité des cas. Il présente cependant un bloc de branche droit (BBD) correspondant à un bloc de conduction au niveau de la branche droite descendante du faisceau de His (*Ohe et al., 1988*). Une cellule de Purkinje acquière un automatisme anormal à l'origine d'extrasystoles ventriculaires qui se propagent par phénomène de réentrée.

Sur le même principe que les TVIs infundibulaires, les TVIs fasciculaires peuvent être traitées par l'administration de vérapamil et en cas de non réponse aux traitements médicamenteux, l'ablation par radiofréquence s'avère nécessaire.

2. Syndrome de Brugada

Le syndrome de Brugada fut décrit pour la première fois en 1992 chez des patients ayant fait un accident de mort subite par FV idiopathique (*Brugada and Brugada, 1992*). La physiopathologie du syndrome de Brugada se décompose en deux parties avec d'une part des perturbations électrophysiologiques provoquant un sus-décalage du segment ST et d'autre part un ralentissement de la VC accompagnés de l'apparition d'arythmie ventriculaire.

La prévalence du syndrome de Brugada varie selon l'origine géographique avec une forte prédominance de la maladie en Asie (estimation d'un cas pour 2500 en Thaïlande) (*Nademanee, 1997*). Généralement, le syndrome est diagnostiqué chez le jeune adulte entre 30

INTRODUCTION

et 40 ans lorsque le patient est asymptomatique. C'est à cet âge que le premier ECG est réalisé. Cependant, l'âge de découverte est variable, il dépend du degré des formes familiales et du caractère transitoire des signes électriques. Le plus jeune patient diagnostiqué pour le syndrome de Brugada n'avait que 2 jours et le plus âgé 84 ans. Ce syndrome est responsable de 4% des morts subites et 20% de ces morts subites se sont produites chez des patients ne présentant aucune anomalie structurelle du cœur (*Antzelevitch et al., 2005*). Les symptômes cliniques de la maladie peuvent être attribués à la survenue d'un trouble du rythme ventriculaire grave soutenu ou non. En l'absence d'une réanimation rapide, le décès du patient peut survenir. Les accidents de mort subite apparaissent souvent la nuit, lorsque le patient est au repos.

Des études de cohortes de patients atteints du syndrome de Brugada et rescapés d'une mort subite, laissent supposer une cause d'origine génétique (*Chen et al., 1998*). En effet, le gène *SCN5A* codant pour la sous-unité α du canal sodique cardiaque situé dans le locus 3p21 du chromosome 3 présente des mutations à l'origine de la maladie. Ces mutations induisent une diminution de la conductance et de la densité des canaux sodiques. Elles sont de types autosomiques dominantes et seraient à l'origine des formes familiales de cette pathologie dans 20% des cas (*Priori et al., 2002*). Des mutations de type « gain de fonction » du gène *KCNQ3* codant pour la sous-unité α du canal $K_{v4.3}$ responsable du courant I_{to} ont été également décrites dans une cohorte de patients présentant le syndrome de Brugada (*Giudicessi et al., 2011*).

Des modifications de l'expression de gènes participant à l'homéostasie calcique ont également été démontrées. Les gènes *RYR2* et *NCX* sont surexprimés dans le VD de patients ayant le syndrome de Brugada (*Gaborit et al., 2009*). Ceci pourrait conduire à des perturbations de l'homéostasie calcique, et conduire à des arythmies ventriculaires. De plus, une publication d'Antzelevitch et ses collègues a mis en évidence une association entre le syndrome de Brugada et l'existence de mutations de type « perte de fonction » de gènes codant pour les canaux calciques de type L associées à un raccourcissement de l'intervalle QT (*Antzelevitch et al., 2007*).

Afin d'établir un diagnostic pour le syndrome de Brugada, différents critères majeurs ou mineurs sont identifiables (*Gussak et al., 2001*). Les critères majeurs sont la présence de signe ECG du syndrome chez des patients avec un cœur normal ou après administration d'un bloqueur des canaux sodiques. Des anti-arythmiques de classe Ia tels que l'ajmaline et la procainamide et des anti-arythmiques de classe Ic comme la flécainide

peuvent démasquer un sus-décalage du segment ST dans les dérivations précordiales droites (*Brugada et al., 2002*). Des agents neuro-hormonaux peuvent moduler le sus-décalage du segment ST. Par exemple, le propranolol (bloqueur β -adrénergique) augmente le sus-décalage du segment ST alors que l'isoproterenol (agoniste β -adrénergique) le diminue. Les critères mineurs sont multiples comme des TVs ou FVs, les syncopes et le contexte familial de mort subite.

Les patients ayant un syndrome de Brugada présentent une morphologie particulière de l'ECG. L'ECG possède un QRS ayant une morphologie de BBD. Il montre également une anomalie de la repolarisation caractérisée par une surélévation du segment ST dans les dérivations précordiales droites. Cet aspect de l'ECG est souvent associé à un risque élevé de mort subite sans cardiopathie sous jacente. De manière plus détaillée, dans le cas du syndrome de Brugada, le complexe QRS se termine par une déflexion positive qui correspond à une surélévation du point J à la jonction entre le complexe QRS et le segment ST (*Alings and Wilde, 1999*). Cette surélévation qualifiée d'onde J est présente dans 2,5% des sujets normaux ayant une repolarisation précoce. Cette surélévation de la phase terminale du complexe QRS est suivie d'un segment ST sus-décalé avec une pente descendante, parfois convexe vers le haut ou en forme de selle, puis d'une onde T négative ou plate avec un intervalle QT normal voir court (**Figure 33**).

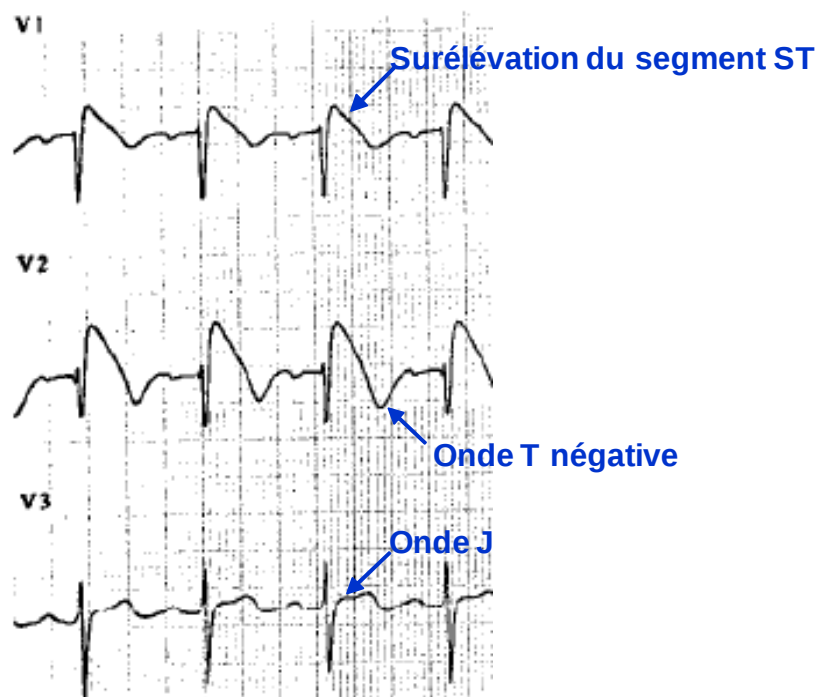


Figure 33. Exemple d'un ECG de patient atteint du syndrome de Brugada. Représentation d'un ECG dans les dérivations précordiales droites V1-V2-V3 d'un patient masculin âgé de 32 ans. En V1, V2, V3, il existe une surélévation du segment ST avec une pente descendante aboutissant à une onde T négative. A la fin du complexe QRS, une déflexion positive correspondant à l'onde J est observée. *Adapté de (Brugada et al., 1998).*

INTRODUCTION

Il existe au sein de la communauté scientifique, deux hypothèses différentes permettant d'expliquer les perturbations électrophysiologiques (surélévation du segment ST, onde J) rencontrées chez les patients atteints du syndrome de Brugada. La première hypothèse est basée sur des troubles de la repolarisation (repolarisation précoce) alors que la deuxième est liée à la présence de troubles de la dépolarisation (dépolarisation tardive).

Hypothèse 1 : Troubles de la repolarisation

L'ECG normal est caractérisé par un segment ST isoélectrique à partir du point J lié à une homogénéité des voltages à la fin de la phase 1 et de la partie précoce de la phase 2 du PA dans l'ensemble du myocarde (**Figure 34A**).

Dans le syndrome de Brugada, une réduction du courant I_{Na} sub-épicaudique est observée, entraînant une accentuation de l'encoche du PA notamment au niveau du VD sub-épicaudique où I_{to} est le plus important. Cette accentuation va provoquer une augmentation du gradient de repolarisation transmural conduisant à un sus-décalage du segment ST. Cette dispersion transmurale de la repolarisation est responsable d'une fenêtre durant laquelle une impulsion prématurée ou une extrasystole peut induire une arythmie réentrante. Si la repolarisation épicaudique précède la repolarisation endocardique, alors l'onde T reste positive et conduit à un segment ST en forme de selle (**Figure 34B**).

Il est possible de trouver une accentuation encore plus importante de l'encoche de la phase 1 du PA liée à une diminution plus marquée du courant I_{Na} et à une augmentation du courant I_{to} s'accompagnant d'un allongement du PA épicaudique. Par conséquent, le gradient transmural va s'inverser conduisant à l'aspect convexe et à l'inversion de l'onde T (**Figure 34C**). Cet allongement du PA épicaudique au niveau du VD conduit à une augmentation de la dispersion de l'APD au niveau épicaudique favorisant ainsi la survenue de réentrée de phase 2 (**Figure 34D et E**).

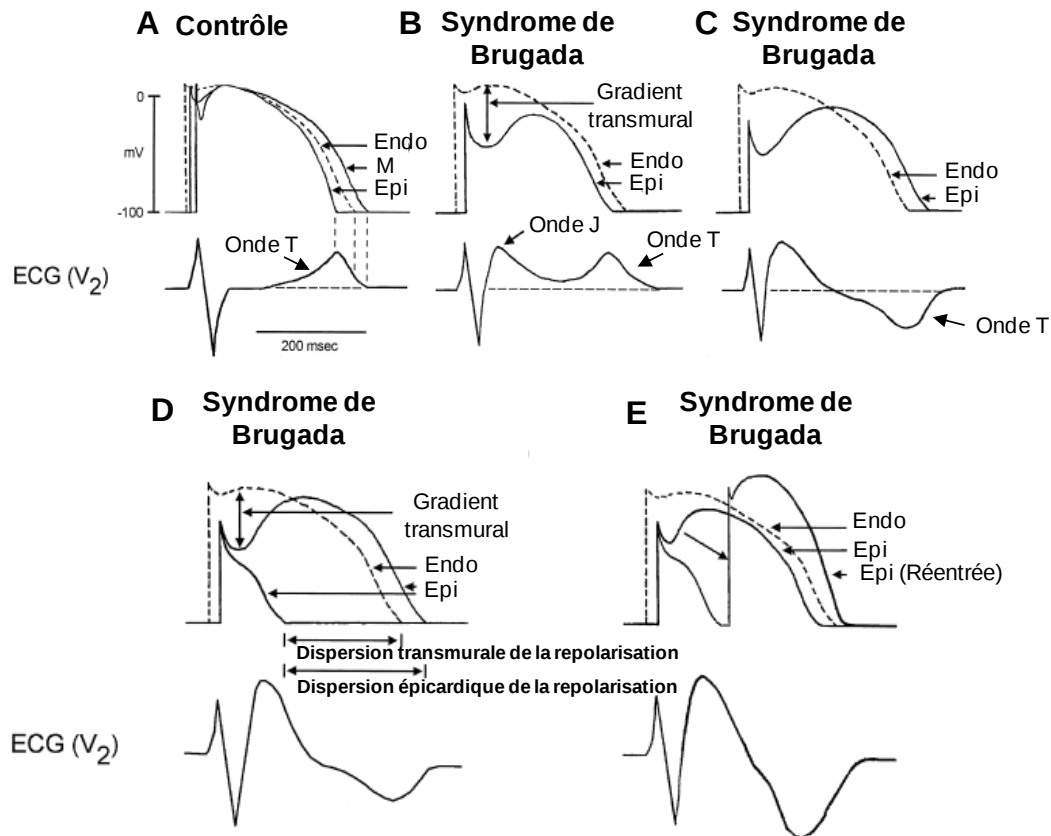


Figure 34. Modèle représentant l'hypothèse de la repolarisation précoce dans le syndrome de Brugada. Représentation de PA épocardique, endocardique et midmyocardique de ventricule accompagnée de l'ECG enregistré dans la dérivation précordiale droite V_2 dans le cas d'un individu sain. Le segment ST est isoélectrique en absence de gradient transmural (A). Dans le syndrome de Brugada, la formation d'un sus-décalage du segment ST en forme de selle s'accompagne d'une onde T positive (B). La formation d'un sus-décalage avec un aspect convexe, présente une onde T négative résultant de la prolongation du PA épocardique par rapport au PA endocardique (C). La perte du dôme de la phase 1 de certains PAs épocardiques est à l'origine d'une dispersion de la repolarisation épocardique. De plus, les PAs endocardiques ne changeant pas, une dispersion transmurale de la repolarisation se met en place (D) favorisant l'apparition de réentrée en phase 2 (E). Adapté de (Naccarelli and Antzelevitch, 2001).

Dans un modèle pharmacologique du syndrome de Brugada par administration de flécainide (bloqueur du canal sodique) ou de pinacidil (activateur des canaux potassiques) sur VD isolé perfusé, il a pu être reproduit la perte du dôme au niveau des PAs épocardiques associée à une élévation du segment ST (Yan and Antzelevitch, 1999). Les auteurs ont montré qu'une stimulation β -adrénergique (isoprotérénol) permet une restauration du dôme de la phase 1 du PA, diminuant ainsi le gradient transmural et l'hétérogénéité de la repolarisation ceci favorisant la régression du sus-décalage du segment ST. Par contre, une stimulation par l'acétylcholine induit un raccourcissement des APDs épocardiques et accentue le sus-décalage du segment ST. L'inhibition du courant I_{to} par le 4-aminopyridine permet de restaurer également le dôme du PA et de normaliser le sus-décalage du segment ST tout en prévenant la survenue d'arythmies.

INTRODUCTION

Hypothèse 2 : Troubles de la dépolarisation

Dans le cas de l'hypothèse 2, la physiopathologie du sus-décalage du segment ST et l'inversion de l'onde T peuvent s'expliquer par des troubles de dépolarisation. Ainsi, il existe un ralentissement de la conduction au niveau du RVOT liée à la perte de fonction du canal $Na_v1.5$ (**Figure 35A**). L'absence initiale de dépolarisation du RVOT contraste avec la conduction normale du reste du VD et provoque une différence de potentiel responsable du sus-décalage du segment ST (**Figure 35B**). Le délai d'activation retarde aussi la repolarisation, ce qui est à l'origine d'une inversion de l'onde T (*Meregalli et al., 2005*) (**Figure 35C**).

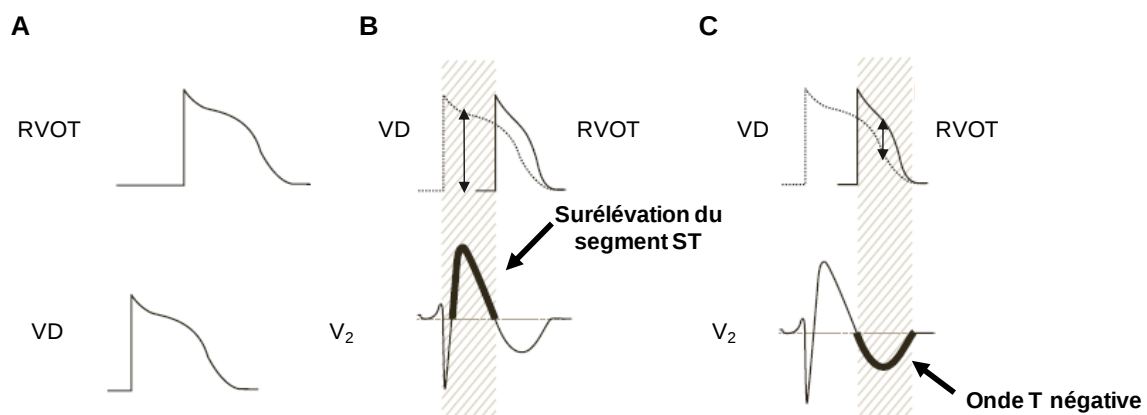


Figure 35. Modèle représentant l'hypothèse de la dépolarisation tardive dans le syndrome de Brugada. Au sein de la cavité ventriculaire droite, le RVOT présente un ralentissement de la conduction par rapport au reste du VD (**A**). Il en résulte des différences de potentiel entre le VD et le RVOT provoquant un sus-décalage du segment ST (**B**). Le délai d'activation entre le VD et le RVOT induit également un retard de la repolarisation à l'origine de l'inversion de l'onde T (**C**). *Adapté de (Meregalli et al., 2005).*

Il existe une forte corrélation entre les troubles de conduction observés et l'apparition de TV ou FV dans le syndrome de Brugada.

Des études expérimentales électrophysiologiques et histopathologiques sur un cœur explanté de patient atteint du syndrome de Brugada ont montré un ralentissement de la VC ainsi que de la fibrose et des infiltrations de tissu adipeux au niveau du RVOT (*Coronel et al., 2005*). De ce fait, la composante structurelle est à prendre en compte dans la physiopathologie du syndrome de Brugada, car elle pourrait être à l'origine du délai significatif de conduction au sein du RVOT.

Le traitement du syndrome de Brugada repose sur l'implantation d'un défibrillateur automatique chez les patients symptomatiques. Une étude clinique menée sur la survie des patients possédant un défibrillateur, un traitement pharmacologique ou aucun

traitement fut réalisée par Brugada et ses collègues (*Brugada et al., 1998*). Cette étude a pu montrer l'efficacité du défibrillateur automatique. En effet, sur 63 patients porteurs du syndrome de Brugada, et suivis durant 34 ± 32 mois, la mortalité totale observée était de 0% chez les patients porteurs d'un défibrillateur, 26% chez les patients recevant un traitement pharmacologique de type β -bloquant, et 31% dans le groupe non traité.

3. Dysplasie arythmogène du ventricule droit

La dysplasie arythmogène du ventricule droit (DAVD) décrite pour la première fois en 1977, repose sur une association d'anomalies électrocardiographiques et histologiques avec une composante génétique (*Fontaine et al., 1999*). Il s'agit d'une cardiomyopathie affectant principalement le VD, caractérisée par des infiltrations adipeuses du myocarde et la substitution de fibres myocardiques par des plages de fibrose dans les couches sub-épicaudiques et médiomurales du VD (*Thiene et al., 2007*) (**Figure 36**).

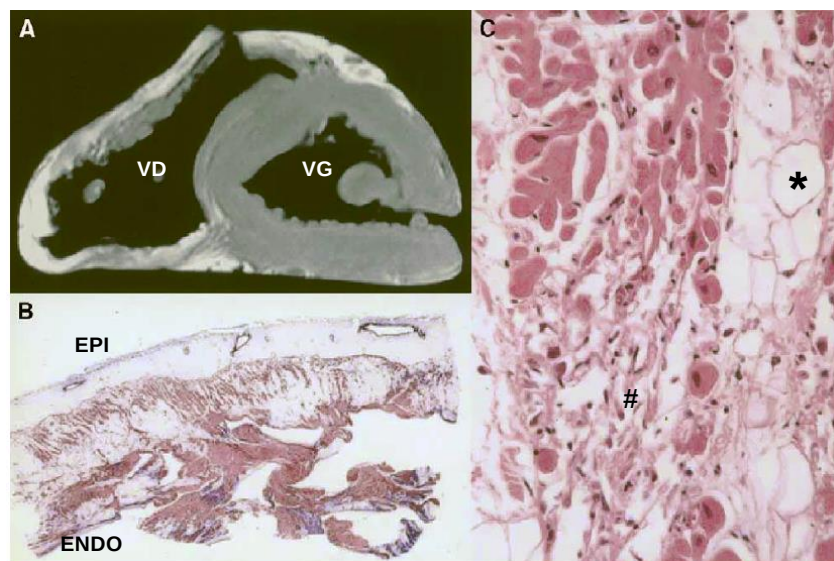


Figure 36. Infiltration adipeuse et fibrose dans le cas de la DAVD. Mise en évidence d'infiltrations adipeuses (*) et de fibrose (#) par imagerie de résonance magnétique (IRM) (A) et par marquage histologique au trichrome Heidenhain (B, C) chez un patient de 28 ans décédé à la suite d'une DAVD. Les régions du myocarde analysées pour l'histologie proviennent de la partie antérieure de la paroi libre du VD. *Adapté de (Basso and Thiene, 2005).*

La conséquence de cette pathologie est l'apparition d'une dilatation du VD d'abord localisée puis diffuse qui évolue sur le long terme en une insuffisance cardiaque. Elle peut être associée à une atteinte ventriculaire gauche. La DAVD est une maladie grave et évolutive qui se manifeste essentiellement par un spectre d'arythmies ventriculaires qui démasque la pathologie comme les ESVs, les TVs et les FVs. Le diagnostic repose sur l'association de critères cliniques, électriques et morphologiques avec la réalisation de

INTRODUCTION

plusieurs examens afin de rechercher des anomalies électriques et architecturales du myocarde.

Les anomalies des propriétés électriques de dépolarisation et de repolarisation sont visibles sur l'ECG au repos ou à l'effort dans les dérivations précordiales droites. L'ECG montre un élargissement du complexe QRS ainsi qu'un BBG témoignant de la présence de troubles de conduction. A la fin du complexe QRS, de petites déflexions positives connues sous le nom d'ondes epsilon prolongent le complexe dans 30% des DAVDs (**Figure 37**) (*McKenna et al., 1994; Saguner et al., 2015*). Les ondes T sont inversées dans les dérivations précordiales droites (*Marcus et al., 2010*) (**Figure 37**).

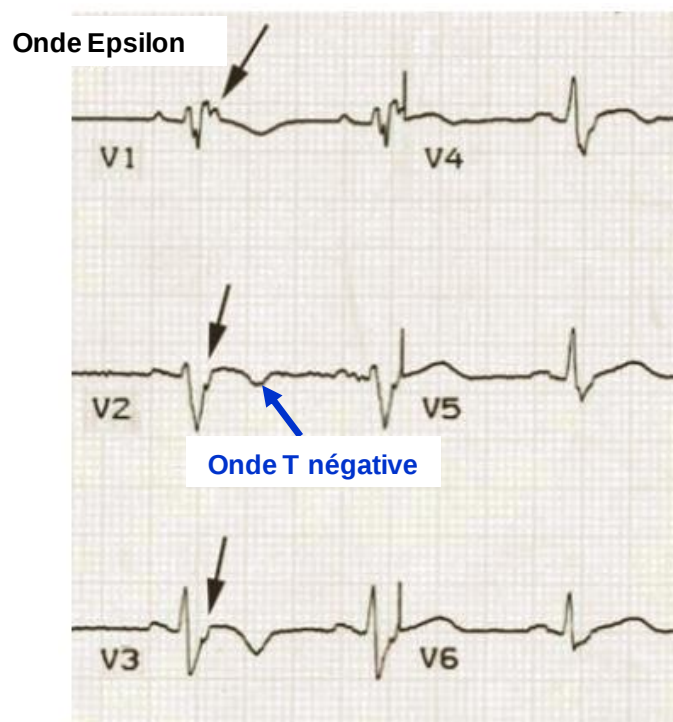


Figure 37. Exemple d'enregistrement ECG d'un patient atteint de DAVD. Les dérivations précordiales droites montrent la présence d'une onde epsilon correspondant à une déflexion positive à la suite du complexe QRS élargi. Dans les dérivations précordiales droites V1-V2-V3 de l'ECG, l'onde T est inversée. *Adapté de (Thiene et al., 2007).*

Les anomalies morphologiques peuvent être mises en évidence par de nombreux examens cliniques comme l'échographie trans-thoracique ou l'IRM cardiaque. L'échographie trans-thoracique permet de dévoiler des anomalies globales et localisées telles que la dilatation du VD, les altérations de la fonction systolique avec la diminution de la fraction d'éjection du VD et des anévrysmes (*Marcus et al., 2010*). L'IRM cardiaque permet en supplément de montrer les infiltrations adipeuses et l'amincissement de la paroi du VD (**Figure 36A**). Les trois principales modifications histologiques se situent au niveau du

« triangle de la dysplasie » situé entre le RVOT, l'apex du VD et l'aire sous tricuspide (*Basso and Thiene, 2005*). L'augmentation de la fibrose ainsi que le développement du tissu adipeux participent au remodelage structurel du VD et indirectement au remodelage électrique. En effet, les conséquences de l'infiltration adipeuse et de la fibrose se manifestent par un ralentissement de l'activation électrique des ventricules à l'origine de réentrée.

La prévalence de la maladie dans la population est plutôt basse avec un cas pour 5000 (*Corrado and Thiene, 2006*). Elle est de forme familiale dans 50% des cas. Il s'agit donc d'une maladie génétique avec une transmission autosomique dominante d'expression variable et de pénétrance partielle. En d'autres termes, deux patients de la même famille avec la même mutation génétique n'auront pas systématiquement la même atteinte. Six gènes ont été identifiés dont quatre codent pour des protéines d'adhésion cellulaire constituant les desmosomes : la plakophiline 2, la desmoplakine, la desmoglérine 2 et la desmocolline 2 par ordre de prévalence de mutation (*Moric-Janiszewska and Markiewicz-Loskot, 2007*). Les desmosomes assurent le couplage mécanique lors de la contraction des cardiomyocytes et assurent la cohésion intercellulaire des cellules. Les mutations dans plusieurs de ces protéines déstabilisent le desmosome amenant ainsi à la séparation physique des cardiomyocytes, et à l'induction de l'apoptose. La rupture des desmosomes facilite la mise en place de la fibrose pouvant être à l'origine des réentrées (*Rampazzo et al., 2014*). Des expériences sur des souris hétérozygotes déficientes en desmoplakine ont montré une augmentation de la fibrose et du tissu adipeux associée à une augmentation de l'apoptose avec une altération de la fonction contractile du myocarde. Ces souris ont également développé des épisodes d'arythmies ventriculaires, rappelant ainsi un phénotype de DAVD (*Garcia-Gras et al., 2006*). Une autre étude sur des cœurs embryonnaires de souris déficientes en plakophiline 2 présente une paroi ventriculaire fine signe de dilatation ainsi que la formation d'anévrismes (*Grossman et al., 2004*). Une extinction par knockdown de l'expression du gène codant pour la plakophiline 2 sur des cardiomyocytes de rats néonataux provoque une diminution considérable du courant I_{Na} et de la VC ainsi qu'un phénomène de réentrée (*Sato et al., 2009*).

D'autres mutations de gènes sont caractéristiques de la DAVD comme le gène *RYR2* (*Milting et al., 2006*) ou le gène codant pour le TGF β 3 (*Transforming growth β 3*) (*Beffagna et al., 2005*). Le TGF β 3 est une cytokine qui stimule la mise en place d'un processus inflammatoire intervenant dans la genèse de la fibrose et qui module l'adhésion cellulaire.

INTRODUCTION

Les patients présentant une mutation du gène *RYR2* risquent de développer des TVs polymorphes catécholaminergiques. Ces TVs polymorphes se déclenchent par stimulation adrénergique et touchent des patients souvent jeunes qui possèdent dans la majorité des cas une structure normale du myocarde. La mutation du gène *RYR2* induit une diminution de l'affinité de FKBP12.6 au récepteur RyR2 provoquant une instabilité du canal et une augmentation de la probabilité d'ouverture de ce dernier en diastole. L'instabilité de la concentration en Ca^{2+} intracellulaire des cardiomyocytes en diastole peut induire des DADs à l'origine de TVs polymorphes catécholaminergiques. Il est nécessaire d'effectuer d'autres recherches afin de définir la contribution exacte de RyR2 dans la DAVD et de déterminer s'il existe une relation directe ou indirecte concernant les liens ultra-structuraux entre le RS et les desmosomes.

Il existe également des DAVDs de forme autosomique récessive qualifiées de maladie de Naxos dont la pénétrance est plus importante. Les patients atteints ont hérité d'une mutation de chacun de leur parent. Elle associe à la DAVD des atteintes cutanées (hyperkératose) et des atteintes capillaires. Une anomalie du gène *JUP* codant pour la plakoglobine a été identifiée.

L'incidence de la mort subite est évaluée à 1-3% par an parmi les patients atteints de DAVD. La DAVD est la cause majeure de mort subite de sujets jeunes d'âge moyen de 35 ans, et dans la moitié des cas cette mort subite est liée à l'effort ou à l'émotion (*Basso et al., 1999*). On connaît l'incidence de la DAVD chez les sportifs décédés de mort subite qui est de 20%.

Le traitement des DAVDs consiste à minimiser le risque d'ESV et de TV. Il existe deux catégories de traitements : les traitements médicamenteux et non médicamenteux. Les traitements médicamenteux sont basés sur l'administration d'anti-arythmiques de classe III (amiodarone) contre les TVs de type réentrante ou de β -bloquants (sotalol) contre les ESVs. Pour les patients dont le traitement médicamenteux est un échec ou présentant d'emblée une mort subite ressuscitée, le traitement non médicamenteux s'avoue être nécessaire. Il consiste à effectuer une ablation par radiofréquence (cautérisation des zones intracardiaques responsables d'arythmie) ou à l'implantation d'un défibrillateur (*Azaouagh et al., 2011*).

4. Insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) correspond à l'incapacité du cœur à maintenir un débit cardiaque suffisant pour répondre aux besoins énergétiques des tissus périphériques.

On distingue les insuffisances cardiaques aiguës et chroniques, ainsi que les insuffisances cardiaques gauches (ICG) et droites (ICD), leur association conduisant à l'IC globale. L'ICG est plus étudiée que l'ICD probablement parce qu'elle touche le cœur gauche qui est responsable de la circulation systémique.

Les informations qui vont suivre concernent les données publiées sur l'ICD. Toutefois, le nombre d'étude relative au VD insuffisant est faible, nous ferons donc de nombreux parallèles avec les résultats obtenus dans l'ICG.

a) Physiopathologie

L'ICD peut être primitive et implique alors une cardiomyopathie droite, comme par exemple la DAVD (Thiene et al., 2007). Le plus souvent l'ICD est secondaire à une hypertension artérielle pulmonaire, une valvulopathie tricuspide ou pulmonaire, un infarctus du VD (Goldstein, 2002) ou la réparation de la tétralogie de Fallot (Wald et al., 2015). Une ICG peut également conduire à une ICD (Haddad et al., 2008a). Une augmentation de la pression du VG peut provoquer une augmentation de la pression des veines pulmonaires induisant une augmentation de la charge barométrique du VD et potentiellement une dysfonction de ce dernier.

La surcharge mécanique est liée à la surcharge volumétrique et barométrique du VD qui correspond respectivement à une augmentation de la pré-charge et de la post-charge. La pré-charge constitue la tension des fibres du myocarde qui se développe à la fin de la diastole dans la paroi du vaisseau au moment de son étirement maximal. La post-charge se définit comme la tension ou l'ensemble des forces qui s'opposent à l'éjection ventriculaire. Une augmentation de la post-charge du VD peut être due à une sténose pulmonaire. De ce fait, le VD s'hypertrophie pour augmenter sa force musculaire afin d'expulser le sang à travers l'AP. Une augmentation de la pré-charge du VD est liée à une insuffisance de la valvule tricuspide et pulmonaire pouvant être due à une fermeture incomplète des valvules s'accompagnant ainsi de régurgitation tricuspide et pulmonaire. En effet, le VD envoie le sang

INTRODUCTION

vers l'AP mais une partie revient en sens inverse, augmentant ainsi le volume de remplissage de la cavité et par conséquent conduit à une dilatation du VD.

Sur le plan physiopathologique, quelque soit le type d'IC, il existe une diminution du débit cardiaque. Le débit cardiaque correspond au produit du volume d'éjection systolique par la fréquence cardiaque. Dans le cas de l'IC, la baisse du débit cardiaque est essentiellement liée à une augmentation du volume télésystolique (volume de sang en fin d'éjection ventriculaire). Le volume télédiastolique (volume de sang maximal du ventricule en fin de diastole) peut lui augmenter ou diminuer selon le type d'IC. Dans un premier temps, le système cardiovasculaire compense ces diminutions et maintient une perfusion adéquate des organes et des tissus. Les mécanismes compensateurs se mettent en place au niveau neurohormonal et au niveau du muscle cardiaque lui-même. L'activation de réflexes extrinsèques neurohormonaux permet de maintenir le débit cardiaque et la pression sanguine (*Ruwhof and van der Laarse, 2000*). Par exemple, l'hypotension active les barorécepteurs qui vont augmenter l'activation du système nerveux sympathique permettant d'augmenter la fréquence cardiaque et la vasoconstriction. La post-charge augmente, la fraction d'éjection et la perfusion des organes comme le rein et le foie diminuent. De ce fait, le système rénine-angiotensine s'active provoquant la sécrétion de rénine. La rénine permet la synthèse d'angiotensine II et d'aldostérone assurant respectivement une vasoconstriction périphérique et la rétention de Na^+ .

Au niveau cardiaque, des mécanismes intrinsèques sont activés par une augmentation de la pré-charge et de la post-charge. Face à une augmentation de la post-charge, le VD est soumis à une hypertrophie concentrique adaptative qualifiée de phase de compensation dans laquelle les myofibrilles s'ajoutent en parallèle conduisant à une augmentation de l'épaisseur des cardiomyocytes (**Figure 38**). Une augmentation de la pré-charge conduit à une hypertrophie excentrique compensatrice du VD dans laquelle les myofibrilles sont ajoutées en série amenant à une augmentation de la longueur des cardiomyocytes (*Hill, 2003*). Le but de cette hypertrophie compensatrice est de normaliser la tension pariétale systolique et diastolique du VD et de réduire la consommation d' O_2 du myocarde.

Selon la loi de Laplace, la tension de la paroi cardiaque est liée à la pression du VD :

$$T = \frac{P \times r}{h}$$

T correspond à la tension développée dans la paroi musculaire, P à la pression transmurale, r au rayon du ventricule et h à l'épaisseur de la paroi ventriculaire. L'augmentation de la pression (P) est compensée par l'augmentation de l'épaisseur de la paroi ventriculaire (h) afin de normaliser la tension pariétale développée. De ce fait, l'hypertrophie ventriculaire compensatrice permet de réduire la contrainte pariétale développée lors de la surcharge. Le phénomène adaptatif ne peut compenser indéfiniment la post-charge. Avec le temps l'épaisseur de la paroi ventriculaire ne peut plus croître de façon à assurer un travail cardiaque considérable. Par conséquent, le flux coronarien nécessaire à la perfusion du cœur hypertrophié n'est plus suffisant pour assurer l'augmentation de la demande en O₂. Afin de maintenir le débit cardiaque, le cœur se dilate. Cette dilatation correspond à l'augmentation du diamètre des cavités du cœur impliquant une augmentation de la longueur des fibres myocardiques permettant une contraction plus efficace et un accroissement du volume d'éjection systolique. Cet effet compensateur de la dilatation cardiaque découle de la loi Franck Starling : l'étirement des sarcomères provoque une augmentation de la contractilité jusqu'à un certain seuil. Si l'étirement devient trop important, la contractilité baisse, et l'IC s'accroît. On parle de phase de décompensation (**Figure 37**).

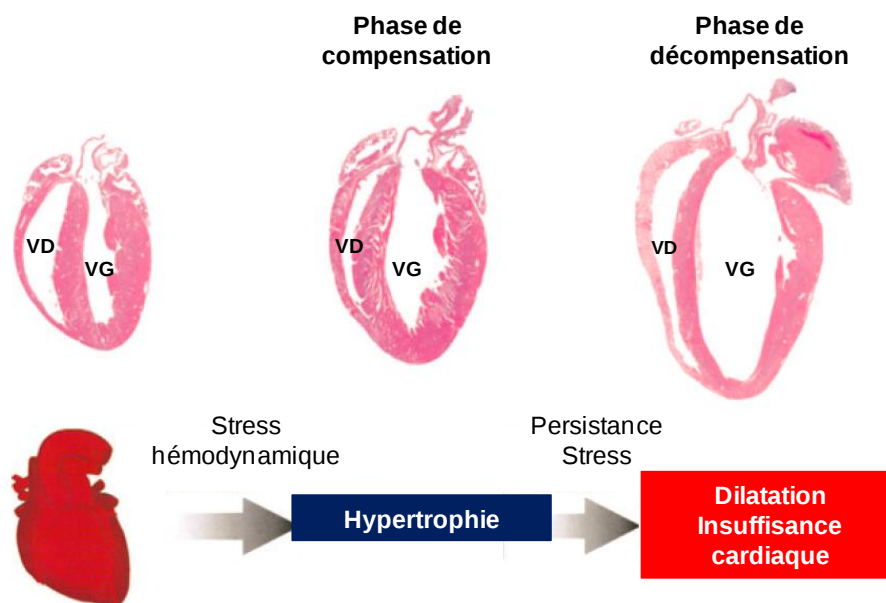


Figure 38. Evolution de la paroi myocardique au cours de la mise en place de l'IC. Représentation de sections transversales des cavités cardiaques d'un cœur de souris dans un modèle de surcharge de pression. Lorsque le myocarde est soumis à une augmentation de la post-charge, le cœur compense par une hypertrophie cardiaque concentrique se traduisant par une augmentation de la masse du cœur, de l'épaisseur des parois et une hypertrophie cellulaire. Cette phase de compensation permet d'assurer un débit cardiaque suffisant face au stress biomécanique. Une fois les limites des mécanismes de compensation atteintes, le cœur décompense par une dilatation. Le diamètre des cavités augmente par un accroissement de la longueur des fibres myocardiques. *Adapté de (Hill, 2003).*

INTRODUCTION

Le nombre de patients en IC est en augmentation constante dans les pays industrialisés. Ce phénomène est lié au vieillissement de la population et à l'amélioration de la prise en charge des pathologies cardiaques. Aux Etats-Unis, on estime environ 5 millions de cas d'IC avec un taux de mort annuel supérieur à 250000 (*Tomaselli and Zipes, 2004*). La prévalence de l'IC augmente avec l'âge. L'âge moyen d'un patient atteint d'IC est de 75 ans. A l'échelle mondiale, le taux de mortalité 1 à 5 ans après un premier diagnostic d'IC cardiaque est compris entre 17 et 45% (*Ponikowski et al., 2014; Stewart et al., 2001*).

Le diagnostic de la pathologie repose sur l'apparition de signes cliniques tels que la dyspnée d'effort (difficulté respiratoire) et la présence d'un œdème aigu du poumon dans le cas de l'ICG. L'hépatalgie précoce accompagnée de troubles digestifs, l'asthénie (fatigue physique), ainsi qu'une hypertension veineuse sont les signes cliniques le plus souvent associés à l'ICD.

Une fois le diagnostic d'IC porté, les symptômes peuvent servir à classer le degré de sévérité de l'IC selon la classification de la New York Heart Association pour l'insuffisance cardiaque (NYHA).

b) Remodelage électrophysiologique

Au niveau cellulaire, l'IC est associée à un remodelage électrophysiologique, une altération de l'homéostasie calcique, une modification des jonctions gap et de la MEC.

Le remodelage électrophysiologique conduit à un prolongement des APDs ventriculaires. Ce dernier peut s'expliquer par une altération de l'expression des canaux ioniques et des transporteurs électrogéniques (**Figure 39**). Le prolongement des APDs est lié à la présence d'une phase plateau plus longue afin de permettre une élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ et donc d'assurer une augmentation de la contraction cardiaque.

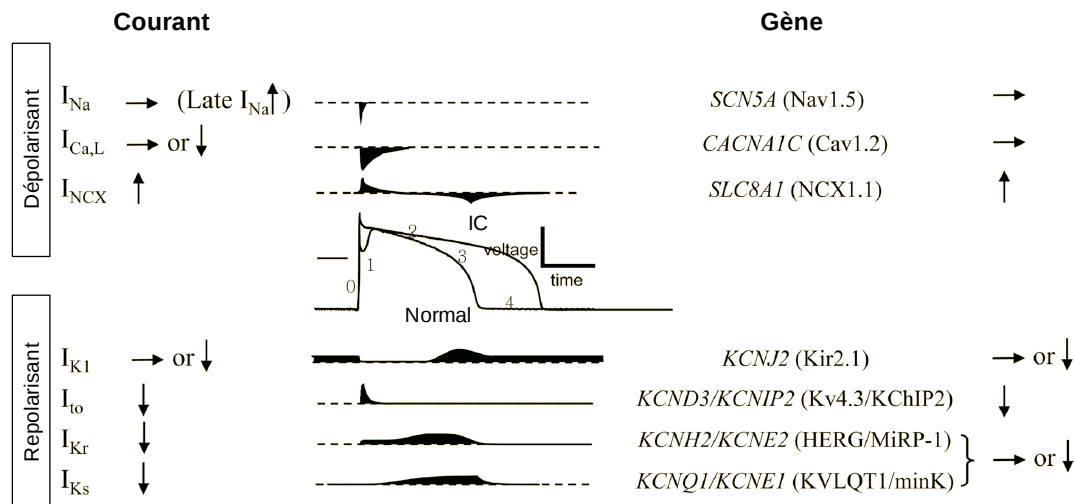


Figure 39. Composante ionique participant au PA ventriculaire d'un mammifère atteint de l'IC. Représentation des courants ioniques dépolarisants et repolarisants (gauche) responsables du PA ventriculaire associés au niveau d'expression des gènes qui sous-tendent ces courants ioniques (droite) lors de l'IC. Les chiffres (0, 1, 2, 3, 4) représentent les différentes phases du PA. *Adapté d'(Aiba and Tomaselli, 2010).*

La repolarisation :

Au cours de l'IC, la densité des courants repolarisants est perturbée (**Figure 39**). Dans la littérature, il est montré que la densité du courant I_{K1} varie au cours de la phase hypertrophique de l'ICG. En effet, la densité de courant I_{K1} est diminuée (Brooksby et al., 1993) ou inchangée (Ryder et al., 1993). Pourtant le niveau d'ARNm de Kir2.1 reste inchangé (Kaab et al., 1998) au cours de l'ICG. Comme au niveau du VG dans l'ICG (Nabauer et al., 1996), la densité de courant I_{to} est diminuée provoquant un prolongement de l'APD du VD au cours de l'ICD (Lee et al., 1997). Dans les cardiomyocytes issus de cœur en ICD, les taux d'ARNm et de protéines codant pour le canal $K_v4.3$ sont diminués (Benoist et al., 2011; Lee et al., 1997). Ces modifications associées au courant I_{to} contribuent à l'augmentation de la durée de la repolarisation. Les courants potassiques I_{Kr} et I_{Ks} sont également diminués dans le myocarde de cœurs défaillants, responsables du prolongement de l'APD. Les niveaux d'ARNm codant pour les canaux $K_v11.1$ et $K_v7.1$ sont diminués dans le VG (Jiang et al., 2000) et dans le VD lors de l'hypertension pulmonaire (Benoist et al., 2011). Les changements régionaux dans l'expression des courants potassiques conduisent à un prolongement et une dispersion de l'APD et par conséquent de l'intervalle QT. L'augmentation de la dispersion de repolarisation favorise les réentrées (Coronel et al., 2009).

Des études expérimentales ont montré que la densité des courants dépolarisants I_{CaL} reste inchangée dans l'ICG (Pitt et al., 2006). Toutefois certains travaux ont révélé une augmentation du courant I_{CaL} dans la phase compensée de l'ICG (Richard et al., 1998) et de

INTRODUCTION

l'ICD (*Lee et al., 1997*). Dans la phase décompensée de l'ICD, le courant I_{CaL} est soit diminué (*Nuss and Houser, 1991*), soit inchangé (*Benoist et al., 2012; Lee et al., 1997*). Il existe une réexpression du programme génétique fœtal dans les cardiomyocytes ventriculaires hypertrophiés lors de l'IC. Par exemple, le courant I_{CaT} a été mesuré dans des cardiomyocytes de VG issus de cœurs de chat après cerclage de l'aorte (*Nuss and Houser, 1993*) et dans des cardiomyocytes de VD d'un modèle de rat ICD (*Takebayashi et al., 2006*). Néanmoins, chez l'homme, le courant I_{CaT} n'a pas été détecté sur des myocytes ventriculaires insuffisants (*Beuckelmann et al., 1991*). Pour l'instant, le rôle du courant I_{CaT} demeure énigmatique au cours du processus pathologique.

La conduction :

Concernant les courants responsables de la phase de dépolarisation, aucune modification du courant I_{Na} dans les modèles d'IC n'a été mise en évidence (*Sakakibara et al., 1993*) (**Figure 39**). Cependant, des études sur des modèles canin et humain d'IC, montrent la présence d'une augmentation du courant I_{Na} à inactivation lente ($I_{Na \text{ late}}$) (*Valdivia et al., 2005*). La persistance de ce courant provoque une surcharge de Na^+ intracellulaire qui favorise le prolongement du PA comme dans le syndrome du QT long congénital de type 3 (*Clancy and Rudy, 1999*).

Au cours de l'ICD, la réduction de l'expression de la protéine Cx43 est associée à une altération de sa localisation spatiale, suscitant un remodelage des jonctions gap (*Uzzaman et al., 2000*). Ce remodelage conduit à une diminution des VC et du ratio d'anisotropie à l'origine de bloc de conduction.

De plus, le myocarde subit un profond remodelage structurel lors de l'IC se traduisant par une augmentation de la fibrose (*Coronel et al., 2013*). L'altération de la MEC contribue à diminuer la fonction contractile du cœur et facilite la genèse de réentrées au cours de l'IC.

c) Remodelage du CEC

Lors de l'IC, l'homéostasie calcique est altérée avec un défaut de la régulation du RS et des récepteurs RyR2 accompagné d'un recaptage anormal du Ca^{2+} liée à la diminution de l'expression de SERCA2a (*Bers, 2006*) (**Figure 40**).

Le niveau d'expression de l'ARNm de RyR2 est diminué dans le cas de l'ICG (*Brillantes et al., 1992*) et de l'ICD (*Kogler et al., 2003*) mais son niveau d'expression protéique n'est pas modifié chez des patients atteints d'IC (*Meyer et al., 1995*). La stimulation

chronique β -adrénergique induit une hyperphosphorylation des récepteurs RyR2 par la PKA ou la CamKII (Curran *et al.*, 2007; Marx *et al.*, 2000) accompagnée d'une dissociation de FKBP12.6 des RyRs, générant une fuite calcique diastolique anormale du RS dans les cœurs défaillants (Yano *et al.*, 2000). Elle produit lors de la systole une désynchronisation de l'ouverture et de la fermeture des RyR2 avec une diminution de l'amplitude des transitoires calciques (Lacampagne *et al.*, 2008). De plus, la désorganisation et la perte des tubules T sont à l'origine du découplage fonctionnel entre les RyR2 et les DHPRs lors de l'IC (Brette and Orchard, 2003).

De nombreuses études ont rapporté une diminution de l'ARNm et de la protéine SERCA2a dans des modèles d'ICG (Zarain-Herzberg *et al.*, 1996) et d'ICD (Benoist *et al.*, 2014). Outre cela, les niveaux d'expression et de phosphorylation du PLB au cours de la pathologie sont abaissés (Benoist *et al.*, 2014; Sande *et al.*, 2002) suggérant un niveau élevé d'inhibition de la pompe SERCA2a. En conséquence, le restockage du Ca^{2+} dans le RS est ralenti, augmentant la concentration de Ca^{2+} cytosolique en diastole (Schmidt *et al.*, 1998). Les effets de cette élévation du Ca^{2+} cytosolique en diastole favorise l'activation de l'échangeur NCX générant un courant transitoire entrant I_{NCX} susceptible de dépolariser la membrane cellulaire après la fin du PA produisant une DAD. Dans le cas de l'ICD, les observations sont légèrement différentes. En effet, des études menées sur des myocytes de VD de rat en hypertension pulmonaire ont montré aussi une diminution de l'activité de la pompe SERCA2a mais avec une augmentation du contenu et de la fraction de relargage de Ca^{2+} du RS lors de la systole (Benoist *et al.*, 2012). Des événements de libération calcique spontanée du RS en diastole appelée « sparks » sont également amplifiés dans le cas de l'ICD (Benoist *et al.*, 2012). Paradoxalement, lors de l'ICD, une élévation de la charge calcique du RS avec une diminution de l'activité de SERCA2a sont incompatibles. Par conséquent, l'accumulation du Ca^{2+} dans le RS peut être dépendante de divers facteurs comme des tampons calciques présents au niveau du RS et de la forte diminution de l'extrusion du Ca^{2+} via NCX (Benoist *et al.*, 2012). En effet, dans le cas de l'ICD, la diminution de la fonction de l'échangeur NCX est plus importante que la diminution de la fonction SERCA2a (Travaux non publiés du Dr. Benoist).

Les niveaux d'expression de l'ARNm et de la protéine codant pour l'échangeur NCX sont augmentés dans l'ICG (Reinecke *et al.*, 1996) sous-tendant une intensification de l'activité de l'échangeur afin de compenser le défaut du repompage du Ca^{2+} par le RS. Cette intensification peut être responsable de DADs (Baartscheer *et al.*, 2003).

INTRODUCTION

D'autre part, la relation force-fréquence est inversée dans l'IC c'est-à-dire que pour des fréquences élevées, l'accélération du rythme cardiaque, non seulement n'augmente pas la contractilité du muscle ventriculaire mais tend à la réduire.

Pour résumer, la diminution de l'activité de la pompe SERCA2a associée à l'augmentation du courant I_{NCX} et la fuite calcique du RS participent à l'inversion de la relation force-fréquence, à la baisse du Ca^{2+} systolique, à l'élévation du Ca^{2+} diastolique et à un courant diastolique dépolarisant (I_{NCX}).

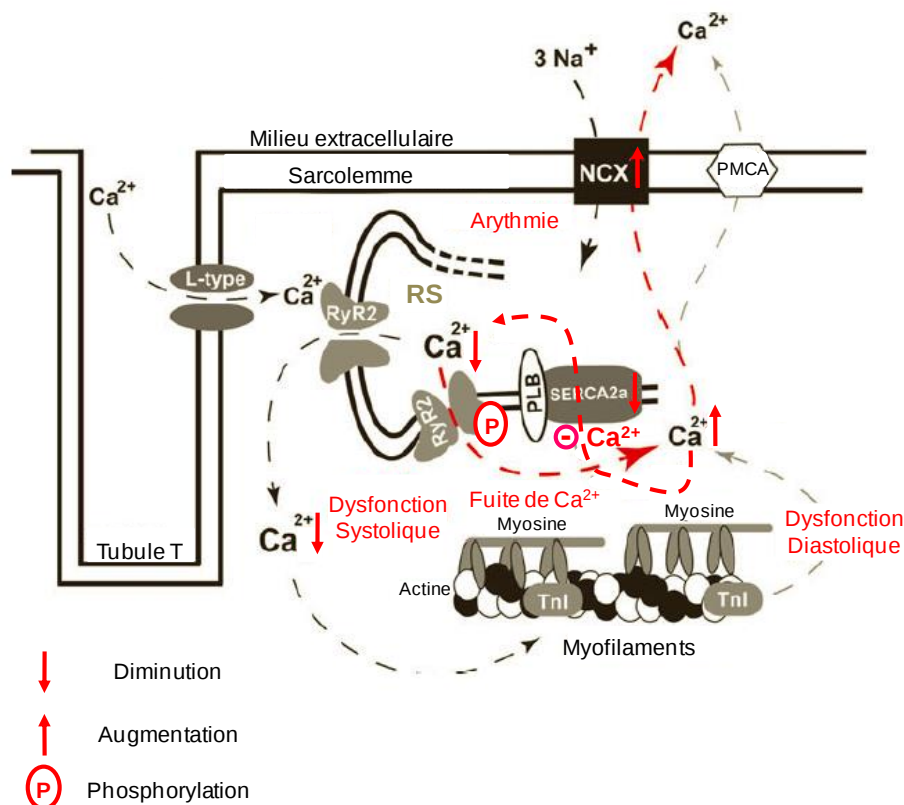


Figure 40. Mécanismes impliqués dans l'altération de l'homéostasie calcique dans un contexte d'ICG. Représentation des transitoires calciques lors de la systole (à gauche du schéma) et de la diastole (à droite du schéma). Au cours de l'ICG, une hyperphosphorylation du récepteur RyR2 favorise la fuite calcique au sein du cytosol. La diminution de l'efficacité de la pompe SERCA2a ainsi que l'augmentation de l'activité de l'échangeur NCX tendent respectivement à réduire la charge calcique du RS et à extruder le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule. La baisse du contenu en Ca^{2+} du RS provoque un déficit de la contraction en systole. *Adapté de (Fischer et al., 2013).*

d) Mécanismes arythmogènes

Les mécanismes arythmogènes se développant chez les patients IC, dépendent du degré du remodelage structurel et électrophysiologique du myocarde, associé à l'altération de l'homéostasie calcique (**Figure 41**). Les modifications des courants ioniques et de la régulation du Ca^{2+} intracellulaire génèrent respectivement la formation d'EADs et de DADs.

L'hétérogénéité de la repolarisation liée à l'allongement des APDs et l'hétérogénéité de conduction corrélée au remodelage des jonctions gap et à la fibrose peuvent engendrer des épisodes de réentrée, TV, FV et une mort subite. D'autre part, dans l'ICD, les altérations de la gestion calcique intracellulaire conduisent à de l'alternance calcique et électrique (*Benoist et al., 2012*), un marqueur reconnu de mort subite (*Rosenbaum et al., 1994*).

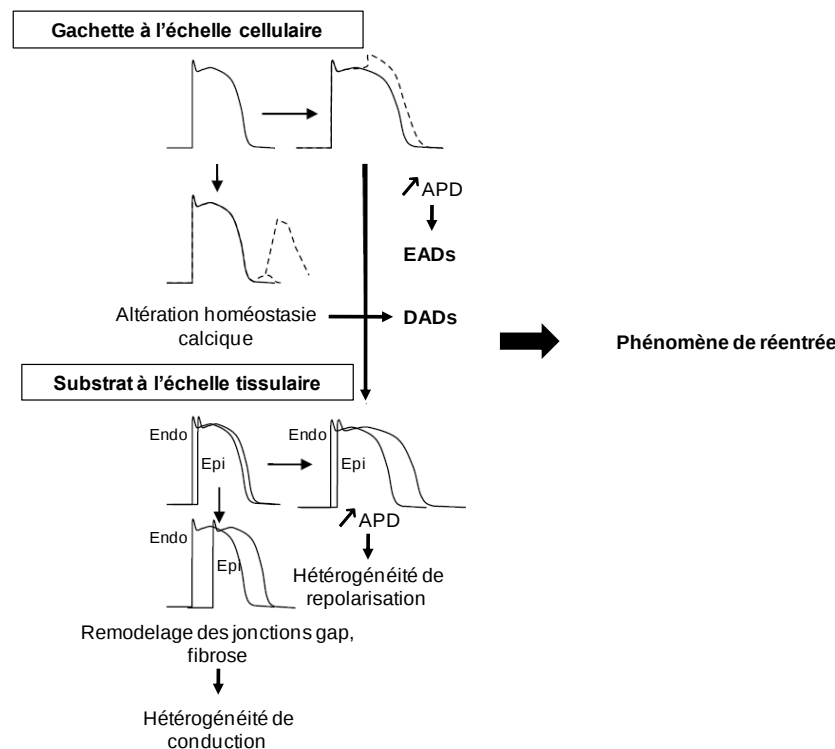


Figure 41. Mécanismes arythmogènes à l'échelle cellulaire et tissulaire lors de l'IC. A l'échelle cellulaire, l'augmentation des APDs durant l'IC peut provoquer des EADs. L'altération de l'homéostasie calcique génère des DADs. A l'échelle tissulaire, l'augmentation des APDs induit une hétérogénéité de la repolarisation au sein du myocarde. Le remodelage des jonctions gap ainsi que la mise en place de zones fibrotiques altèrent la conduction de l'activité électrique. La combinaison de ces différents éléments engendre un phénomène de réentrée parfois fatal chez des patients IC. *Adapté de (Coronel et al., 2013).*

e) Traitements

La thérapeutique mise en place peut-être ou non médicamenteuse. Les traitements médicamenteux font intervenir des agents vasodilatateurs afin de diminuer la pré-charge par chute de la pression du VG. Les agents vasodilatateurs assurent également la baisse de la post-charge en diminuant le travail cardiaque et en augmentant le débit. Ils améliorent aussi la circulation coronarienne. L'administration de diurétique joue un rôle dans la réduction de la surcharge hydrosodée. Des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II, des β -bloquants, des inhibiteurs de l'aldostérone sont pareillement employés permettant de diminuer les pré- et post-charge. Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine II et les

INTRODUCTION

inhibiteurs de l'aldostérone assurent une diminution de la résistance vasculaire périphérique et donc de la post-charge. Ils permettent également la diminution de la synthèse de la MEC et participent donc à la diminution de la fibrose myocardique. Les β -bloquants diminuent l'effet provoqué par la stimulation chronique du système β -adrénergique. Ainsi, ils ralentissent la fréquence cardiaque et l'excitabilité du myocarde.

Les traitements non médicamenteux, souvent en phase terminale, font appel à la chirurgie avec par exemple la mise en place de pompe à contrepulsion intra-cardiaque aortique qui permet l'amélioration de la perfusion coronaire et la post-charge du VG. Il existe également l'implantation de pompes d'assistance ventriculaire qui remplacent la fonction de pompage du cœur jusqu'à ce qu'un greffon soit disponible. L'implantation d'un défibrillateur cardiaque est réalisée chez les patients ayant une forte sévérité de l'IC et présentant un haut risque de décès par arythmie ventriculaire. De plus, la dysfonction électrique induit un asynchronisme ventriculaire souvent délétère. Ainsi, une resynchronisation cardiaque par stimulation biventriculaire est indiquée chez les patients présentant une forme sévère d'IC selon la classification NYHA. Pour terminer, la transplantation cardiaque reste la thérapie ultime de l'IC.

5. Cardiomyopathie congénitale : Tétralogie de Fallot

Les cardiomyopathies congénitales dont la fréquence est comprise entre 4 et 8 naissances vivantes pour 1000, sont des malformations cardiaques survenant au cours de la cardiogénèse durant la vie intra-utérine. Elles peuvent être héréditaires ou sporadiques, et représentent une cause majeure de mortalité dans la première année de vie (*Grabitz et al., 1988*).

Grâce au progrès de la médecine, de la prise en charge des jeunes patients, et de la chirurgie réparatrice néonatale, 85% de ces enfants arrivent à l'âge adulte.

Les cardiopathies congénitales peuvent être ordonnées sur le plan anatomique ou physiologique. Selon la classification physiologique, les cardiopathies sont classées de manière fonctionnelle en référence au flux sanguin et aux conséquences hémodynamiques de leur anatomie. Ainsi, il existe les cardiopathies cyanogènes et non cyanogènes. La tétralogie de Fallot (TOF) constitue la plus fréquente des cardiopathies cyanogènes. Elle toucherait 3 naissances sur 1000 avec le même ratio garçon-fille, et représenterait 7 à 10% des cardiopathies congénitales (*Apitz et al., 2009; Egbe et al., 2014*).

Dans cette thèse, nous porterons notre attention sur cette pathologie ainsi que sur les conséquences post-opératoires.

a) Aspects anatomiques de la pathologie

La TOF fut décrite pour la première fois en 1671 par Niels Stensen. En 1888, Etienne-Louis Fallot, médecin anatomo-pathologiste, donna une description plus complète sur le plan anatomique, physiologique et clinique de cette pathologie qu'il qualifia de « maladie bleue » après avoir étudié des cœurs de jeunes patients cyanosés. Il fut le premier à qualifier la pathologie de « tétralogie » du fait de l'association de quatre caractéristiques anatomiques anormales : une sténose pulmonaire, une communication inter-ventriculaire (CIV), une dextroposition de l'aorte (chevauchement de l'aorte) et une hypertrophie ventriculaire droite concentrique (Bailliard and Anderson, 2009) (Figure 42).

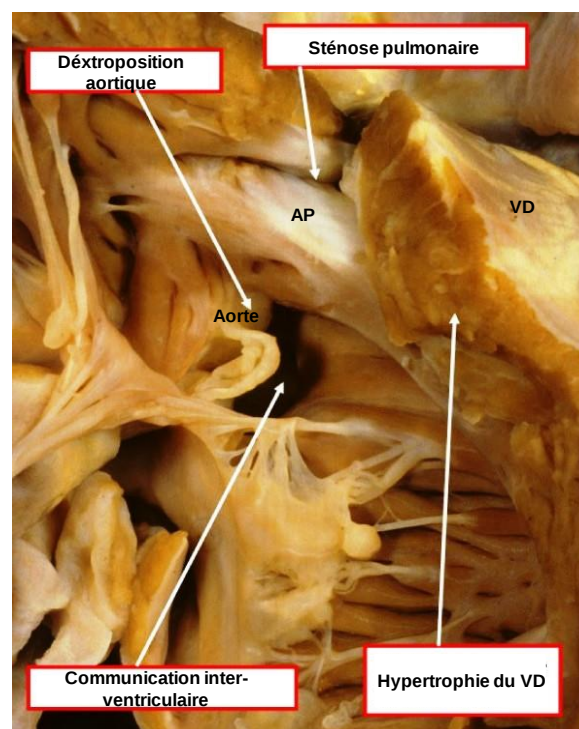


Figure 42. Représentation de la paroi antérieure du VD issue d'un cœur de patient autopsié atteint de la TOF. Ce cœur présente les quatre malformations cardiaques associées à la TOF : la sténose pulmonaire, la communication inter-ventriculaire, la dextroposition aortique et l'hypertrophie du VD. Adapté de (Bailliard and Anderson, 2009).

Il existe les TOFs de formes classiques dites régulières et des formes atypiques qualifiées d'irrégulières. Les formes atypiques sont définies par la présence des quatre caractéristiques morphologiques associées à d'autres malformations. Par exemple, certains patients présentent de multiples CIVs, une communication inter-auriculaire, un arc aortique à

INTRODUCTION

droite (25% des cas). Une anomalie des artères coronaires peut se présenter chez environ 5% des patients TOF avec notamment l'artère coronaire droite qui croise la face antérieure de l'infundibulum pulmonaire. Dans certains cas, des anomalies des APs sont observées avec une anomalie dans la naissance du tronc artériel pulmonaire, une hypoplasie pulmonaire et rarement l'absence de l'AP gauche. Le défaut de la valvule pulmonaire (présence de valves bicuspidées et non tricuspides) retrouvé chez 3 à 6% des patients, engendre une dilatation importante des APs (Saygi et al., 2014). Dans les formes les plus sévères, les patients peuvent présenter une atrésie pulmonaire qui correspond à une obstruction complète de l'AP se traduisant par une absence de communication entre le VD et l'AP. Dans ces circonstances, la vascularisation pulmonaire est assurée par le canal artériel ou par des collatérales aorto-pulmonaires (Bailliard and Anderson, 2009).

Dans la forme classique de la TOF (**Figure 43**), la CIV située sous l'anneau aortique est large de nature péri-membraneuse et unique dans la majorité des cas. Elle est responsable d'un shunt du sang d'un ventricule à l'autre.

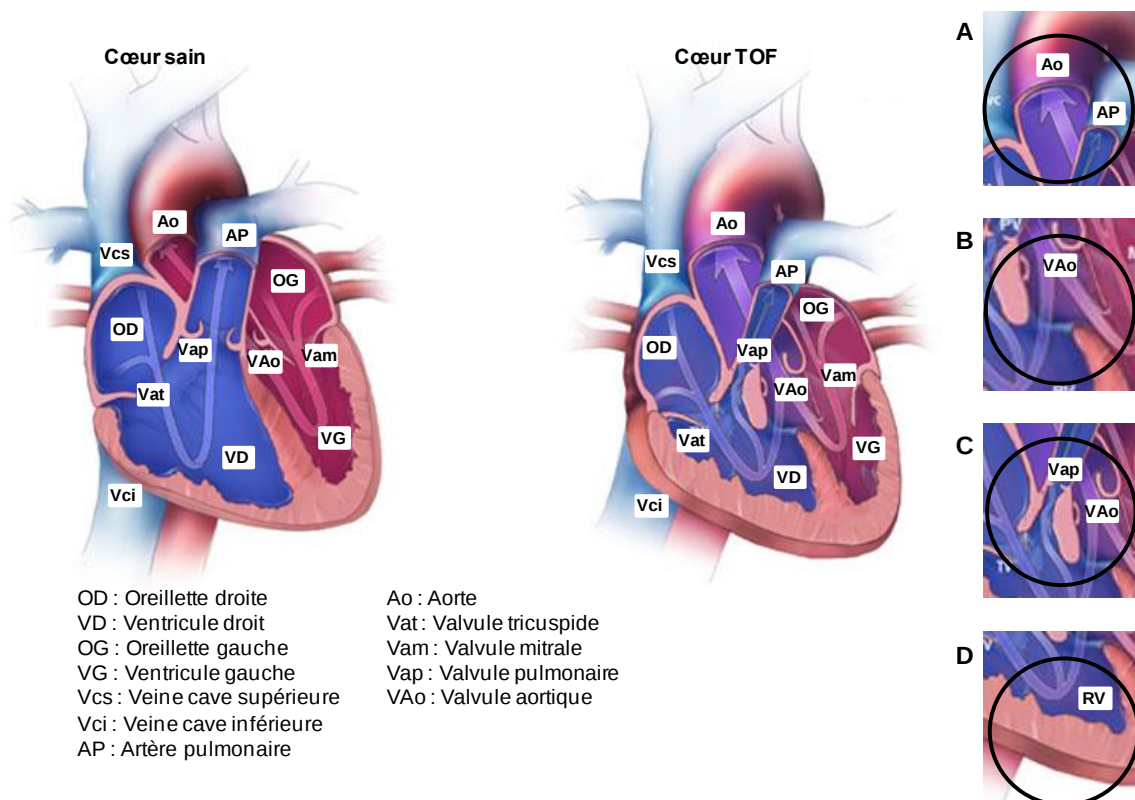


Figure 43. Forme classique de la TOF. Ce schéma représente la morphologie structurelle et les flux sanguins dans un cœur sain (à gauche) et Fallot (à droite). Dans le cœur TOF, la CIV (**B**) entraîne un shunt droite-gauche à forte pression d'éjection. La sténose pulmonaire (**C**) empêche l'écoulement normal du sang du VD vers l'AP et limite sa réoxygénation dans les poumons. L'obstacle à l'éjection (CIV, sténose pulmonaire) est responsable d'une augmentation de la pression intra-ventriculaire du VD à l'origine d'une hypertrophie du VD (**D**). De plus, les cœurs TOF présentent un chevauchement de l'aorte sur le septum inter-ventriculaire (**A**). Adapté du site internet <http://www.cdc.gov/ncbddd/heartdefects/tetralogyoffallot.html>

La sténose pulmonaire est souvent infundibulaire et de type musculaire susceptible d'évoluer avec le temps. Par exemple, une augmentation de la contractilité ou une baisse de la pré-charge diminue le diamètre de la chambre de chasse infundibulaire ou RVOT, accentuant la sténose et freinant le flux pulmonaire. Elle peut se situer au niveau de la valvule pulmonaire (sténose pulmonaire), en dessous ou au-dessus de la valvule pulmonaire (sténose sous ou supra valvulaire pulmonaire) mais aussi au niveau des APs. Dans deux cas sur trois, la sténose pulmonaire est associée à une hypoplasie des branches de l'AP. La sévérité de la sténose pulmonaire va influencer le sens et la force du shunt au niveau de la CIV. Comme la CIV est large, l'importance des débits est en rapport avec les résistances à l'éjection des ventricules. Si la sténose pulmonaire est serrée, le shunt droite-gauche du sang s'effectue avec un débit pulmonaire faible. Par contre, si la sténose pulmonaire est modérée le shunt sera gauche-droite avec un débit pulmonaire plus élevé et une pression au sein du VD partiellement augmentée. L'hypertrophie du VD est secondaire à la surcharge de pression du VD. L'aorte se situe à cheval sur le septum inter-ventriculaire juste au dessus de la CIV et reçoit le sang des deux ventricules (*Becker et al., 1975*).

Le plus souvent la TOF est une pathologie isolée mais elle peut être associée à d'autres syndromes tels que la trisomie 21 et le syndrome de Di George respectivement dans 25% et 15% des cas (*Villafane et al., 2013*).

b) Aspects embryologiques de la pathologie

La TOF repose sur une malformation cardiaque dite cono-troncale résultant d'une anomalie unique : mauvaise rotation du septum conal (infundibulaire) qui sépare normalement les chambres de chasse ventriculaire droite et gauche avec bascule antérieure de ce dernier. Il en résulte un mauvais alignement entre le septum musculaire et le septum conal, rendant impossible la formation du septum membraneux et aboutissant à une CIV (**Figure 44**). Le mauvais alignement du septum est également responsable de la dextroposition de l'aorte. Les autres caractéristiques anatomiques rencontrées dans la forme classique de la TOF sont les conséquences directes de ce mauvais alignement. En effet, la sténose pulmonaire est due à un rétrécissement de l'orifice sous-pulmonaire causé par le mauvais positionnement des tissus fibreux et musculaires du septum anormalement formés et des trabécules ventriculaires (*Di Felice and Zummo, 2009*).

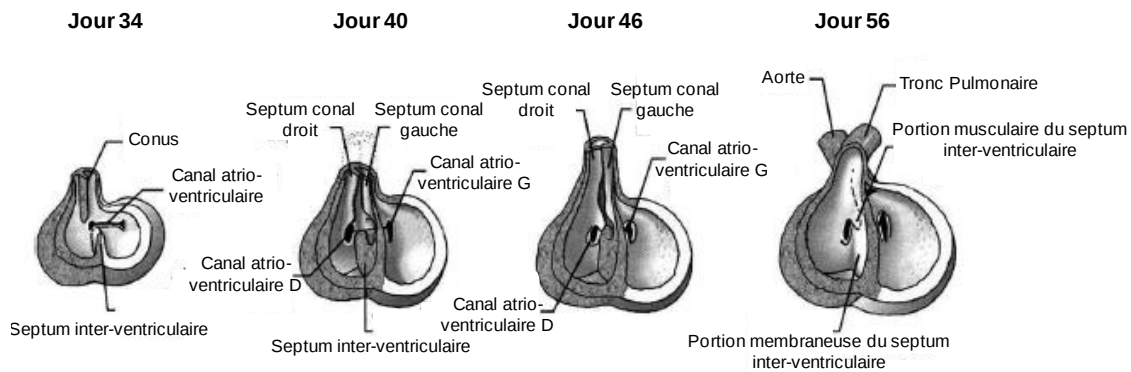


Figure 44. Mise en place du septum inter-ventriculaire et septation du conus dans un coeur humain sain. La mise en place du septum membraneux assure la fusion du septum conal et du septum musculaire. La septation du conus permet la mise en place des deux chambres de chasse ventriculaire c'est-à-dire l'infundibulum pulmonaire (RVOT) et l'infundibulum aortique. *Adapté de (Di Felice and Zummo, 2009).*

La perturbation de la formation de ces structures durant le développement embryonnaire proviendrait soit de la migration, soit de la différenciation d'un groupe de cellules : les cellules de la crête neurale. Expérimentalement, une ablation de la crête neurale avant que la migration cellulaire ne se produise aboutit à des malformations telles que la présence d'un vaisseau unique lié à l'absence de la septation de la voie d'éjection (tronc artériel commun) (*Neeb et al., 2013*).

De plus, il a été montré le rôle des cellules précardiaques du deuxième champ cardiaque dans la pathologie de la TOF. Une altération de la prolifération, de la migration et de la différenciation des cellules progénitrices du deuxième champ cardiaque conduirait aux malformations cardiaques de la TOF (*Ward et al., 2005*).

c) Aspects génétiques de la pathologie

L'hypothèse d'une composante génétique est envisagée dans le déterminisme de la pathologie de la TOF. En effet 10 à 27% des TOFs sont associées à des anomalies chromosomiques. L'étiologie de la TOF est dite multifactorielle car elle est le résultat d'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, et stochastiques (*Villafane et al., 2013*). Certaines études ont identifié des gènes qui pourraient être impliqués dans l'apparition de la pathologie : les gènes *GATA4*, *NKX2.5*, *TBX1*, *ZFPM2*. Cependant, les mécanismes par lesquels les mutations conduisent à l'altération de la morphogénèse cardiaque, restent obscurs. Le gène *GATA4* code pour une protéine qui forme un complexe transcriptionnel GATA4-FOG2. Une mutation de ce gène joue un rôle dans l'apparition de la TOF notamment dans l'altération des cellules du second champ cardiaque (*Di Felice and Zummo, 2009*).

On retrouve dans 4% des patients atteints de la TOF, une mutation du gène *NKX2.5* (Goldmuntz *et al.*, 2001). Ce gène code pour une protéine homéobox essentielle dans la morphogénèse cardiaque. Une substitution de l'acide aminé arginine par la cystéine en position 25 a été identifiée dans la majorité des cas de TOF (McElhinney *et al.*, 2003).

Une microdélétion au niveau du locus 22q11 est rencontrée dans la plupart des pathologies cono-troncales telles que le syndrome de Di Georges, la TOF (Saliba *et al.*, 1999). Le gène *TBX1* situé au niveau de ce locus est muté dans ces pathologies. La mutation de ce gène provoque une modification dans la migration des cellules de la crête neurale responsable d'anomalies dans la septation du conus. Le screening du chromosome 22 peut être effectué chez les fœtus et les nourrissons atteints de ces pathologies (Paladini *et al.*, 1998).

Une mutation du gène *ZFPM2* est présente dans 4% des cas de TOF (Pizzuti *et al.*, 2003). Ce gène code pour un facteur de transcription qui co-régule l'activité du facteur de transcription GATA4. De ce fait, ces modifications ont des conséquences sur l'activation des gènes cardiaques régulés en aval de *ZFPM2* comme le gène *GATA4* (Nemer *et al.*, 2006). Une extinction du gène *ZFPM2* chez des souris provoque un ensemble de malformations cardiaques congénitales : la présence d'un myocarde ventriculaire fin, une absence de la formation des artères coronaires, et les malformations caractéristiques de la TOF, induisant la mort intra-utérine des animaux (Svensson *et al.*, 2000).

Les protéines NKX2.5, GATA4 sont exprimées dans les cellules précardiaques du second champ cardiaque. Une mutation génétique des gènes présents dans ces cellules ainsi que l'ablation de ces cellules conduiraient à la pathologie TOF (Di Felice and Zummo, 2009) (**Figure 45**).

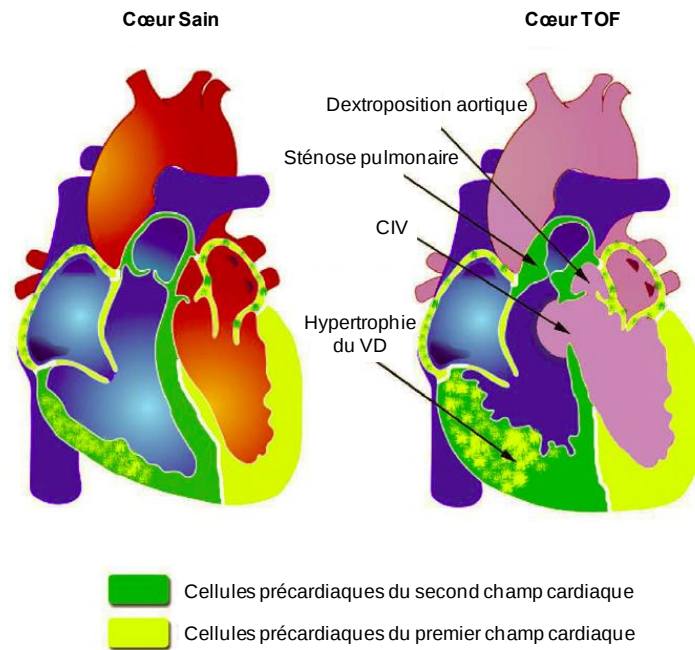


Figure 45. Cellules progénitrices cardiaques dans la TOF. Représentation des quatre malformations cardiaques associées à la forme classique de la TOF avec les régions dérivées des cellules précardiaques du premier (jaune) et du second (vert) champ cardiaque. Les malformations cardiaques de la TOF sont dues à une altération de la migration, différenciation des cellules progénitrices issues du second champ cardiaque. *Adapté de (Di Felice and Zummo, 2009).*

d) Signes cliniques

Les nourrissons atteints de la forme classique de la TOF sont le plus souvent asymptomatiques et sont qualifiés de « Fallots roses ». Le tableau clinique dépend de la sévérité de la sténose pulmonaire mais dans la majorité des cas elle est modérée. Les nourrissons possèdent un débit pulmonaire suffisant pour ne pas induire une cyanose malgré la CIV et la sténose pulmonaire modérée. De ce fait, le shunt au niveau de la CIV est gauche-droite. L'IC n'est pas observée chez les « Fallots roses ». Sur le plan clinique, un souffle systolique permet d'évoquer le diagnostic de la TOF qui sera confirmé par un examen échographique (Apitz *et al.*, 2009).

A l'opposé, certains nouveau-nés possèdent une sténose pulmonaire sévère et sont qualifiés de « Fallots bleus ». Ils présentent un shunt droite-gauche à travers la CIV provoquant une cyanose progressive. La cyanose est légère au début jusqu'à la fermeture du canal artériel qui s'effectue trois jours après la naissance. Elle devient visible et centrale (touchant à la fois les muqueuses et les téguments) lors de l'effort du nourrisson (pleurs, tétée). Le patient est cyanosé en raison du shunt droite-gauche mais également parce que le débit pulmonaire est insuffisant. Le débit et la pression pulmonaire restent bas du fait de la

présence de la sténose pulmonaire. Si les résistances vasculaires systémiques s'élèvent, le flux pulmonaire augmente, le shunt droite-gauche et la cyanose diminuent. Les conséquences cliniques de la cyanose sont de moins en moins observées car les enfants sont pris en charge très tôt après la naissance. Cependant, ces manifestations cliniques associées à la cyanose peuvent être de différentes natures : hippocratisme digital qui se développe progressivement ou encore un accroupissement fréquent après l'effort afin d'augmenter le retour veineux et de diminuer les résistances vasculaires systémiques ainsi que le shunt droite-gauche.

Le malaise hypoxique signe d'une sténose sévère peut apparaître chez les enfants souvent après l'âge d'un an pour ceux n'ayant subi aucune réparation chirurgicale. Les éléments déclencheurs sont des émotions, une agitation de l'enfant ou une déshydratation. Le malaise se caractérise par l'obstruction complète de la chambre de chasse droite avec une faible saturation en O₂. Le souffle systolique disparaît lors de l'auscultation témoignant de la fermeture du RVOT. De ce fait, le passage du sang désaturé ne s'effectue pas dans l'AP mais dans l'aorte via le shunt droite-gauche (Jonas, 2009).

e) Examens cliniques et diagnostiques

Les examens cliniques sont divers une fois le diagnostic suspecté. Il y a quelques années l'ECG et la radiographie thoracique étaient utilisés afin de confirmer le diagnostic. L'ECG permet de mettre en évidence l'hypertrophie du VD avec la présence d'une onde R prédominante et d'une petite onde S dans les dérivations précordiales droites. De plus, la largeur du complexe QRS est le reflet de la gravité de la dilatation du VD. La radiographie thoracique met en évidence une silhouette cardiaque caractéristique du cœur Fallot en forme de « sabot » ainsi qu'une hypoperfusion pulmonaire. La forme du cœur en « sabot » est due à un mouvement de l'apex du VD vers le haut du fait de l'hypertrophie du VD.

Aujourd'hui, l'échographie cardiaque est réalisée chez les patients atteints de la TOF. Elle permet d'examiner l'intensité et la direction des flux cardiaques, la sténose pulmonaire, la taille et le nombre des AP droite et gauche, la taille de la CIV, le degré de dextroposition de l'aorte, et le positionnement anormal des coronaires.

Le cathétérisme cardiaque rarement utilisé de nos jours, reste un examen pré-opératoire pour la visualisation de la sténose pulmonaire et l'implantation anormale des coronaires.

L'IRM est un examen qui renseigne également sur les caractéristiques anatomiques de la TOF. Il apporte des informations sur l'hémodynamique du cœur comme la fraction d'éjection

INTRODUCTION

des deux ventricules. Les régurgitations pulmonaire et aortique peuvent être aussi quantifiées par l'IRM.

La détection de la TOF peut être réalisée sur le cœur fœtal lors de l'examen échographique anténatal. Si durant la grossesse une TOF est suspectée, une recherche d'anomalies chromosomiques est effectuée (*Khoshnood et al., 2005*).

f) Traitement médical et chirurgie réparatrice

Le traitement médical lors d'une crise hypoxique sur un patient non opéré de la TOF consiste à administrer de l'O₂ afin de diminuer la vasoconstriction pulmonaire (*Bailliard and Anderson, 2009*). Le patient doit être en position gèneu-pectorale. L'injection de bêta bloquant tel que le propranolol permet de contrer les catécholamines qui aggravent la crise hypoxique. Si la crise hypoxique survient dans le contexte d'une hypotension ou d'une hémorragie, l'administration de plasma ou de sang est une mesure nécessaire. Néanmoins, les crises hypoxiques doivent être considérées comme une indication à intervenir chirurgicalement car ces traitements ne sont prescrits que sur du court terme.

La pathologie de la TOF est potentiellement létale si elle est non traitée. En effet, la probabilité de survie de patients n'ayant subi aucune réparation chirurgicale sur des durées de 1, 3 et 10 ans est limitée respectivement à 66%, 49% et 24% (*Gorla et al., 2012*).

Les techniques chirurgicales permettant de corriger la TOF ont connu de profonds progrès au cours des années, permettant ainsi d'assurer une prise en charge de plus en plus précoce des patients. Cependant, le débat autour de la question sur le choix du « bon moment » pour effectuer la chirurgie réparatrice reste ouvert (*Pozzi et al., 2000*).

Dans les années 40, le traitement des patients atteints de la TOF était basé sur une chirurgie dite palliative avec la réalisation d'un shunt de Blalock-Taussig (shunt gauche-droite) ou anastomose systémico-pulmonaire. Elle permettait de garantir une perfusion efficace de la voie pulmonaire à partir de l'artère sous clavière. Ce n'est qu'en 1954 avec l'avènement de la circulation extracorporelle que Lillehei réalisa la première réparation chirurgicale. Les premières corrections chirurgicales complètes ont entraîné un taux de mortalité élevé (50%), c'est pour cette raison qu'une approche en deux temps a été envisagée (*Jonas, 2009; Karl, 2012*).

De ce fait, durant les années 70, il était habituel de procéder en premier lieu à une anastomose classique de Blalock-Taussig pour augmenter le flux pulmonaire, une anastomose

de Potts (entre l'aorte descendante et l'AP gauche), ou l'anastomose de Waterston (entre l'aorte ascendante et l'AP droite) (*Pozzi et al., 2000*). Cette première intervention chirurgicale était suivie par une correction totale vers l'âge de 5-10 ans. Malheureusement, cette stratégie maintenait une hypoxie et une surcharge de pression du VD. De plus, les anastomoses de Potts et de Waterston ont été abandonnées car elles pouvaient déformer l'arbre vasculaire pulmonaire et induire une hypertension pulmonaire par excès de débit.

Aujourd'hui, la correction chirurgicale totale s'effectue durant la première année de vie entre 3 et 6 mois, et elle est nécessaire afin d'assurer la survie des jeunes patients à moyen et long terme (*Tamesberger et al., 2008*). Chez les enfants âgés de moins de un an présentant une TOF, la vascularisation pulmonaire en développement est exposée à une pression anormalement basse et à un flux sanguin diminué, ce qui provoque une baisse des échanges gazeux au niveau des alvéoles pulmonaires. Une chirurgie tardive peut donc engendrer une réduction irréversible des zones d'échanges gazeux.

Concernant les formes les plus complexes ou irrégulières de la TOF, une chirurgie en deux temps est parfois préconisée : un traitement chirurgical palliatif (shunt Blalock-Taussig modifié) et une correction chirurgicale complète. Cette organisation permet aux nouveaux nés de grandir dans de bonnes conditions afin de pouvoir être apte à supporter la correction totale. L'anastomose de Blalock-Taussig modifiée, utilise une prothèse tubulaire en polytétrafluoroéthylène, placée entre l'artère sous-clavière et l'AP. Cette méthode apporte des avantages en comparaison au shunt classique : adaptation du calibre de la prothèse en fonction de l'âge du patient, diminution de la mortalité chez les nourrissons (*Gladman et al., 1997; Villafane et al., 2013*).

La première correction chirurgicale totale en première intention date de 1973. Elle est réalisée sous circulation extracorporelle et hypothermie modérée (25-28°C). L'opération chirurgicale repose sur la fermeture de la CIV, la séparation de la circulation systémique et pulmonaire, et la levée de l'obstacle sur la voie pulmonaire.

Dans certain cas, si le canal artériel persiste, il est ligaturé avant le clampage de l'aorte ascendante afin d'empêcher la perfusion pulmonaire. Différentes approches peuvent être envisagées par le chirurgien : ventriculotomie droite, transatriale droite (transpulmonaire).

L'approche par ventriculotomie droite (**Figure 46A**) consiste en la réalisation d'une incision de taille limitée dans l'infundibulum pulmonaire afin d'accéder à la sténose pulmonaire. Cette approche permet d'élargir l'infundibulum et d'accéder à la CIV pour la refermer. Par cette

INTRODUCTION

approche, la CIV peut être fermée sans traction importante de l'anneau tricuspideen et la mise en place du patch transannulaire est facilitée (Karl, 2008). Cependant, cette technique est limitée du fait du risque de diminution de la contractilité et de la dilatation du VD. Si le trajet des artères coronaires est anormal c'est-à-dire présent sur l'infundibulum, alors l'approche par ventriculotomie est contre-indiquée.

L'approche chirurgicale transatriale (transpulmonaire) (**Figure 46B**) est préférée car elle préserve la contractilité du VD et diminue la dilatation de ce dernier (Sfyridis et al., 2013). Néanmoins, elle engendre un retrait du muscle myocardique assez important pour atteindre l'infundibulum et pourrait ainsi provoquer des lésions cicatricielles importantes.

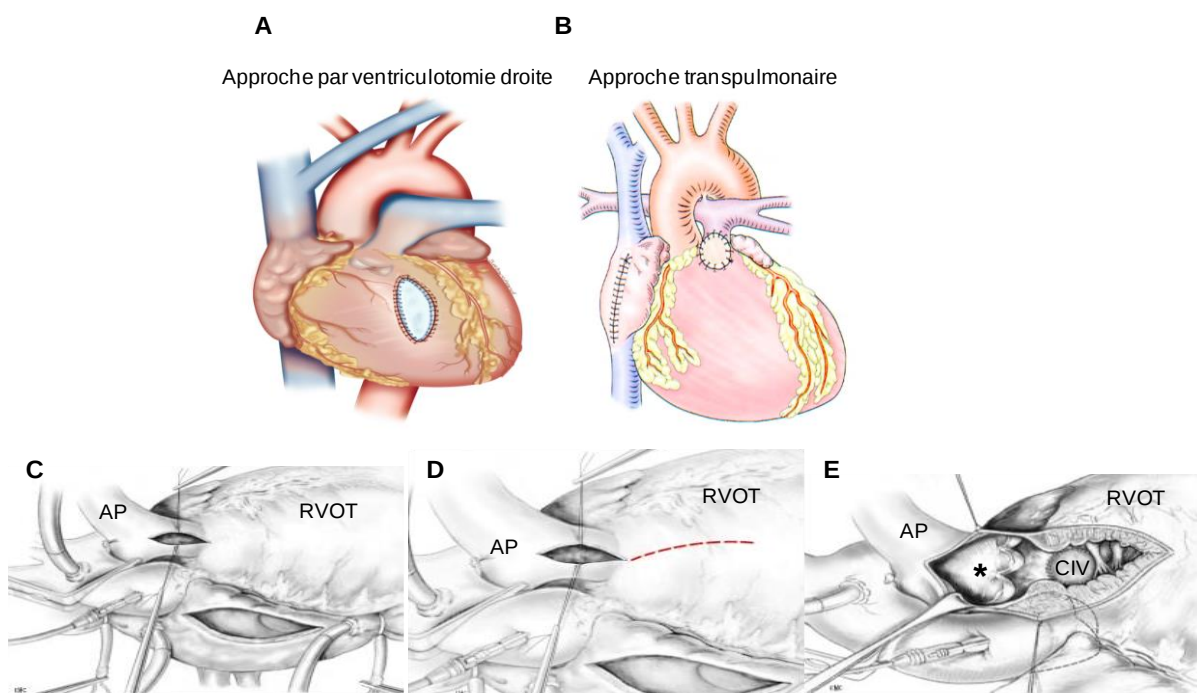


Figure 46. Approches chirurgicales. Représentation des deux approches chirurgicales : ventriculotomie droite (A) et transpulmonaire (B). Concernant l'approche transpulmonaire, une incision longitudinale est réalisée au sein de l'AP (C). Par la suite une légère incision au sein du RVOT est pratiquée (D). L'incision a été prolongée le long du RVOT pour les besoins du schéma. Habituellement elle est plus courte et on ne voit pas l'ensemble de la CIV ainsi que le patch de fermeture (E). Exposition de la sténose pulmonaire (*). Adapté du site internet <http://www.em-consulte.com/article/16012/tetralogie-de-fallot-reparation-complete-de-la-for>.

La fermeture de la CIV s'effectue à partir d'un patch Dacron® tout en prenant soin de ne pas léser le faisceau de His qui chemine le long du bord inférieur de la communication. La CIV est fermée sans traction excessive de l'anneau tricuspideen pour éviter de léser les cordages de la valvule. La résection de la sténose pulmonaire consiste à retirer la bande fibreuse ou musculaire obstructive. L'élargissement de la voie d'éjection du VD est fait avec du péricarde autologue traité ou pièce de Dacron®. Une bougie ou dilatateur de Hegar est placée dans l'AP afin de mesurer le diamètre de l'anneau valvulaire et du tronc pulmonaire

(Karl, 2012). L'utilisation de deux patchs positionnés sur l'AP et sur le RVOT ou un patch unique infundibulo-pulmonaire sont préconisés lorsque l'anneau valvulaire pulmonaire est normal. Si le diamètre mesuré est supérieur aux valeurs limites fixées par rapport à la surface corporelle du patient, le RVOT sera uniquement élargi avec une pièce de péricarde autologue. Par contre si le diamètre mesuré est inférieur aux valeurs limites fixées, l'anneau valvulaire est fendu et le tronc pulmonaire est élargi par un patch transannulaire de Dacron® doublée de péricarde. Par conséquent, l'agrandissement de la valvule pulmonaire par valvotomie peut conduire par la suite à une insuffisance valvulaire pulmonaire (Jonas, 2009).

La réparation chirurgicale totale supprime la cyanose et l'hypertrophie du VD ; normalise le flux pulmonaire et favorise la croissance de l'arbre vasculaire des poumons. La mortalité opératoire de la correction totale est inférieure à 1%, toutefois la plupart des nourrissons opérés auront besoin d'une deuxième intervention à l'âge adulte en raison du développement fréquent d'une insuffisance pulmonaire ou d'une sténose pulmonaire résiduelle (Giannopoulos et al., 2004).

g) Evolution post-opératoire

La durée de vie de patients ayant subi une réparation chirurgicale complète de la TOF ne cesse d'augmenter au cours des années. Aujourd'hui, le taux de survie 30 ans après une correction complète, est de 85% (Bailliard and Anderson, 2009). Ainsi, le nombre d'adulte porteur de tétralogie de Fallot réparée (rTOF) est en croissance perpétuelle. Cependant, les résultats chirurgicaux sur le long terme ne certifient pas une « guérison définitive » car la mortalité dite tardive touche un pourcentage significatif d'opérés avec un taux de mort subite de 2 à 3% par décennie post-opératoire (Gatzoulis et al., 2000b). Dans la majorité des cas, la correction ne garantit pas la pleine restauration de la fonction cardiaque et s'accompagne de cicatrices anatomiques et fonctionnelles pouvant perturber la séquence d'activation électrique et la fonction mécanique.

De ce fait, environ 21% de patients rTOF subissent une réintervention chirurgicale dans les 20 ans suivant la chirurgie réparatrice complète (Jonas, 2009).

La mortalité post-opératoire est secondaire aux lésions résiduelles et aux troubles du rythme. Les cicatrices anatomiques et fonctionnelles sont diverses : une insuffisance valvulaire pulmonaire, une sténose pulmonaire résiduelle, une CIV résiduelle, une dilatation de l'aorte.

INTRODUCTION

Insuffisance valvulaire pulmonaire (IVP) : L'IVP est considérée comme la complication post-opératoire la plus répandue de la rTOF. Environ 54 à 60% de patients rTOF développent une IVP (*Schultz and Wernovsky, 2005*). La valvule pulmonaire des patients TOF est souvent pathologique sur le plan anatomique. L'obstacle infundibulaire lié à la déviation du septum conal empêche le développement normal de la valvule pulmonaire. De plus, la chirurgie réparatrice complète comprend une incision de l'anneau pulmonaire et la mise en place d'un patch transannulaire qui favorise la régurgitation pulmonaire (RP). Il est en effet rare que la valvule pulmonaire soit continente à l'issue de la chirurgie suggérant ainsi la présence d'une fuite pulmonaire du sang de l'AP vers le VD.

Le degré de l'IVP est un facteur pronostique important pour la fonction ultérieure du VD. En effet, la RP, quelque soit son degré est bien tolérée pendant de nombreuses années. Cependant, elle s'accompagne d'une dilatation progressive du VD touchant préférentiellement le RVOT. Par ailleurs, cette dilatation peut occasionner une insuffisance tricuspидienne (secondaire à la dilatation de l'anneau), des troubles du rythme cardiaque et une dysfonction du VD.

La présence d'anévrisme au niveau du RVOT contribue à augmenter le volume systolique du VD et diminuer sa fraction d'éjection (*Davlouros et al., 2002*). Le patch péricardique d'agrandissement infundibulaire entraîne fréquemment une dyskinésie du RVOT.

Les patients rTOF présentent une intolérance progressive à l'effort avec une prédisposition aux arythmies pouvant conduire à une mort subite dans les cas les plus graves.

De ce fait, le remplacement de la valvule pulmonaire est donc préconisé (*Oechslin et al., 1999*). Environ 38% de patients rTOF subissent une substitution valvulaire pulmonaire (*Schultz and Wernovsky, 2005*).

Sténose pulmonaire résiduelle : Elle est due à la présence d'une fibrose myocardique ou à un élargissement chirurgical insuffisant du RVOT. La sténose peut se situer à différents niveaux tels que l'infundibulum, les valves pulmonaires, le tronc pulmonaire, ou les branches pulmonaires. Elle majore l'IVP en créant un obstacle à l'éjection du VD. Ainsi, la sténose pulmonaire provoque une surcharge de pression au niveau du VD (*Zdradzinski et al., 2014*) qui peut conduire à une diminution de la contractilité de ce dernier (*Karl, 2012*). Au-delà d'un certain seuil, lorsque le rapport de la pression systolique du VD sur la pression systolique du VG est supérieur à 0,6 ; une réintervention chirurgicale peut s'avérer nécessaire (*Giannopoulos et al., 2004*). Environ 93,1% de patients présentant une sténose pulmonaire résiduelle se font à nouveau opérer 15 ans après la première chirurgie (*Kim et al., 2013*).

CIV résiduelle : Retrouvée chez 10 à 20% de patients rTOF, elle est secondaire à une chirurgie imparfaite ou à une déhiscence du patch (*Preminger et al., 1994*). Par conséquent, la correction chirurgicale doit être envisagée.

Dilatation de l'aorte : Environ 14,8% de patients rTOF présentent une dilatation de l'aorte. La diminution de la distensibilité aortique contribue à la dilatation aortique, à la régurgitation aortique et à la dysfonction du VG (*Kay et al., 2013*). Deux hypothèses ont été postulées afin d'expliquer la dilatation de l'aorte chez les patients rTOF. La première hypothèse serait due à la présence chronique du shunt droite-gauche provoquant un stress hémodynamique au niveau de l'aorte (*Capelli et al., 1982*). La seconde hypothèse pourrait s'expliquer par la présence d'une anomalie aortique chez le patient TOF dès la naissance (*DeVore et al., 1988*). Le remplacement de la valvule aortique est parfois nécessaire mais reste rare.

Troubles du rythme : Le remodelage myocardique ventriculaire induit par la surcharge en pression, en volume et par la fibrose cicatricielle, participe au développement de zones de conduction lentes.

De plus, la présence de troubles de conduction est fréquente à la suite d'une correction chirurgicale totale. Ils se situent à différents étages de l'axe His-Purkinje et sont la conséquence directe d'une lésion chirurgicale. La forme la plus sérieuse est une lésion du faisceau de His au niveau du bord inférieur de la CIV responsable d'un bloc auriculo-ventriculaire (*Gillette et al., 1977*). Cette lésion est de plus en plus rare car les chirurgiens ont appris à localiser le trajet habituel du faisceau de His. Au niveau intra-ventriculaire, un BBD est systématiquement présent chez les patients rTOF lié à la présence de la CIV (*Gelband et al., 1971*).

Ces troubles de conduction sont visibles sur l'ECG avec par exemple un élargissement du complexe QRS synonyme d'un retard d'activation du VD résultant du BBD. L'échographie réalisée chez des patients rTOF a révélé la présence d'un asynchronisme de contraction du VD et du VG. Le BBD serait donc associé à une altération de la séquence d'activation des deux ventricules. Cette atteinte bilatérale pourrait expliquer l'absence d'efficacité de la stimulation seule du VD et suggère une stimulation biventriculaire (*Bordachar et al., 2008*).

D'après Gatzoulis et ses collaborateurs, le prolongement du complexe QRS serait le reflet d'une dilatation du VD et non d'une hypertrophie de ce dernier (*Gatzoulis et al., 1995*). Par ailleurs, la présence de l'élargissement progressif du complexe QRS avec un aspect fragmenté résulte de l'existence de plages de fibrose myocardiques retrouvées au niveau du RVOT, de la cavité ventriculaire droite mais également des parois ventriculaires gauches (*Babu-Narayan et*

INTRODUCTION

al., 2006). La fragmentation du complexe QRS est associée à une dysfonction du VD et à la présence d'un anévrisme du RVOT chez les patients rTOF (*Shanmugam et al.*, 2013). La présence d'un complexe QRS large supérieur à 180 ms est un facteur prédictif d'arythmies ventriculaires touchant 30% des patients rTOF telles que les TVs monomorphiques mais aussi de mort subite (*Balaji et al.*, 1997; *Khairy et al.*, 2010).

Une augmentation hétérogène de la repolarisation ventriculaire est observée chez les patients rTOF comme en témoigne la dispersion de l'intervalle QT (*Sarubbi et al.*, 1999). Les variations régionales et temporelles de la repolarisation ventriculaire chez les rTOF représentent un substrat pathophysiologique augmentant l'instabilité électrique à l'origine d'arythmies (*Gatzoulis et al.*, 1997; *Helbing et al.*, 2002).

Différentes régions anatomiques (incisions chirurgicales, patch, valves) peuvent favoriser la survenue de blocs de conduction et d'isthmes favorables à la réentrée ventriculaire autour du tissu inexcitable (*Downar et al.*, 1992) (**Figure 47**). La cartographie ventriculaire permet de mettre en évidence quatre isthmes chez le patient rTOF : un 1^{er} isthme entre l'anneau tricuspide et la cicatrice ou le patch infundibulaire antérieur ventriculaire droit (isthme le plus souvent impliqué dans les arythmies ventriculaires), un 2^{ème} isthme entre l'anneau pulmonaire et la ventriculotomie latérale ventriculaire droite, un 3^{ème} isthme entre l'anneau pulmonaire et le patch de fermeture de la CIV, et un 4^{ème} isthme entre le patch de fermeture de la CIV et l'anneau tricuspide (*Zeppenfeld et al.*, 2007).

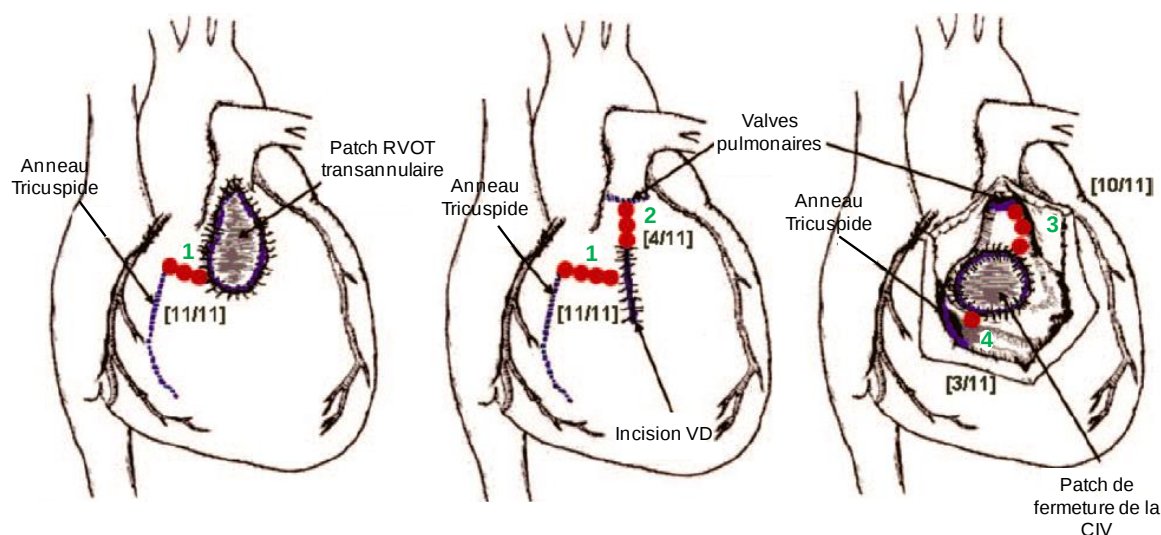


Figure 47. Isthmes dans la tétralogie de Fallot. Représentation schématique de la localisation des quatre isthmes (lignes rouges). L'isthme 1 entre l'anneau tricuspide et le patch RVOT transannulaire est responsable de TV dans l'ensemble de la cohorte de patients constituant cette étude. L'isthme 3 entre l'anneau pulmonaire et le patch de fermeture de la CIV contribue aux TVs chez 10 patients sur 11. L'isthme 2 entre l'anneau pulmonaire et l'incision du VD, et l'isthme 4 entre le patch de fermeture de la CIV et l'anneau tricuspide sont responsables respectivement de 36,4% et de 27,3% de TVs chez ces patients. Adapté de (*Zeppenfeld et al.*, 2007).

La procédure d'ablation par radiofréquence consiste à induire une TV, repérer le circuit d'arythmie ainsi que le ou les isthmes impliqués, puis créer une ligne de bloc entre les deux obstacles anatomiques et vérifier l'existence d'un bloc bidirectionnel avec la non inductibilité en fin de procédure.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Il est bien établi que l'infundibulum pulmonaire ou RVOT est au centre de pathologies arythmogènes associées au ventricule droit. Il est à l'origine de 75-90% des tachycardies ventriculaires idiopathiques, et d'arythmies ventriculaires décrites dans le syndrome de Brugada, la dysplasie arythmogène du ventricule droit et la tétralogie de Fallot réparée.

Des études ont démontré que le RVOT possédait une origine embryologique différente des ventricules, mais ses propriétés électrophysiologiques et structurelles ont été peu investiguées jusqu'à ce jour (*Boukens et al., 2009*).

Nous avons émis l'hypothèse que cette origine embryologique différente conférerait au RVOT une structure et des propriétés électrophysiologiques distinctes conduisant à la mise en place d'un substrat contribuant à l'arythmogénicité de cette région.

C'est dans ce contexte scientifique que nous avons voulu dans un premier temps caractériser sur le plan électrophysiologique et structurel cette région anatomique du cœur chez le cochon sain de l'*in vivo* à l'*ex vivo* et du cœur entier à la cellule. La finalité de cette étude étant de mieux comprendre en quoi le RVOT constitue un substrat arythmogène dans de nombreuses pathologies.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à une cardiomyopathie congénitale : la tétralogie de Fallot, dans laquelle l'infundibulum pulmonaire serait le siège d'un potentiel remodelage arythmogène.

Comme cela a été décrit dans l'introduction, le nombre d'adultes vivant avec une cardiomyopathie congénitale cyanogène corrigée est en constante croissance liée au progrès de la médecine et de la chirurgie cardiaque réparatrice. Le vieillissement de ces cardiomyopathies congénitales « réparées » comme la TOF sont associées à des troubles du rythme cardiaque, des cicatrices anatomiques fonctionnelles et une dysfonction ventriculaire droite qui se majorent avec le temps (*Gatzoulis et al., 1995; Sarubbi et al., 1999; Zeppenfeld et al., 2007*).

Actuellement, il existe certaines données sur des cohortes de patients corrigés de la TOF présentant une altération de la fonction systolique accompagnée d'une surcharge volumique du VD (*Lytrivi et al., 2004; Marie et al., 1992*).

OBJECTIFS

La compréhension des composantes électriques et structurelles à l'origine des complications hémodynamiques et électrophysiologiques est nécessaire afin de développer de nouveaux axes thérapeutiques.

Nous avons émis une première hypothèse sur la présence d'un remodelage électrophysiologique et structurel pro-arythmique du ventricule droit dans un modèle porcin mimant la réparation de la tétralogie de Fallot.

Si des études cliniques ont démontré chez des patients opérés de la tétralogie de Fallot des anomalies électrophysiologiques du ventricule droit, peu d'études se sont intéressées au ventricule gauche dans ce contexte et ce malgré l'interdépendance ventriculaire qui lie les deux chambres.

De ce fait, nous avons formulé une deuxième hypothèse sur la présence d'un remodelage sur le plan électrique et histologique du ventricule gauche sur le même modèle porcin de la tétralogie de Fallot réparée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'ensemble des expérimentations animales mentionnées au cours de cette thèse ont respecté les règles d'expérimentation European Union Council Directive 86/609/EEC ainsi que le comité d'éthique local.

Elles ont permis une caractérisation multi-échelle du modèle animal utilisé de l'*in vivo* à l'*ex vivo* et de l'organe entier à la molécule.

De plus, au sein du laboratoire, nous avons eu la chance de corréler notre étude sur le modèle animale avec du tissu humain explanté sur le plan histologique. D'après l'accord de l'Agence de la Biomédecine, le projet CAdENCE (fibrillation CARDiaque et DyssyNChronie Electrique du cœur) consiste à utiliser des prélèvements de cœurs humains de patients décédés afin de caractériser les propriétés électrophysiologiques, structurales et métaboliques du cœur entier à la cellule.

I/ Expérimentation animale sur modèle porcin

1. Cochons sains

Des cochons mâles de race Large White d'un poids compris entre 40-50 kg âgés de 4 mois sont utilisés.

Les animaux sont prémédiqués avec de la kétamine (10 mg/kg, Vibrac) et de l'acepromazine (0,1 mg/kg, Vetoquinol) par voie intramusculaire. Lors de l'entrée en bloc opératoire, les cochons sont intubés puis ventilés via un mélange d'isoflurane (Vibrac)/oxygène respectivement 2% et 100%. L'anesthésie est réalisée par une injection par voie intraveineuse d'une solution de pentobarbital sodique (5 mg/kg, Ceva).

Après ouverture de la cage thoracique afin de mettre en évidence le cœur de l'animal, l'héparine (anticoagulant) est administrée par voie intraveineuse (200 UI/kg, PanPharma).

2. Le modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée

Des cochons mâles de race Large White d'un poids inférieur à 12 kg âgés d'un mois sont opérés par le Docteur François ROUBERTIE afin de créer un modèle animal de tétralogie de Fallot réparée (rTOF) (Thambo *et al.*, 2012).

La prémédication et l'anesthésie des animaux sont réalisées selon le protocole décrit dans la section Cochons sains. Une thoracotomie latérale est effectuée afin d'accéder au cœur du cochon.

Par la suite, différents actes chirurgicaux sont pratiqués afin de réaliser le modèle rTOF :

- une fuite pulmonaire par excision de 2 valves pulmonaires créant ainsi une surcharge volumique ventriculaire droite et à terme une dilatation du VD
- une ouverture du RVOT avec la pose d'un patch Dacron® afin de reproduire la fibrose cicatricielle
- une sténose pulmonaire par cerclage de l'AP provoquant une surcharge de pression induisant une hypertrophie du VD (**Figure 48**).

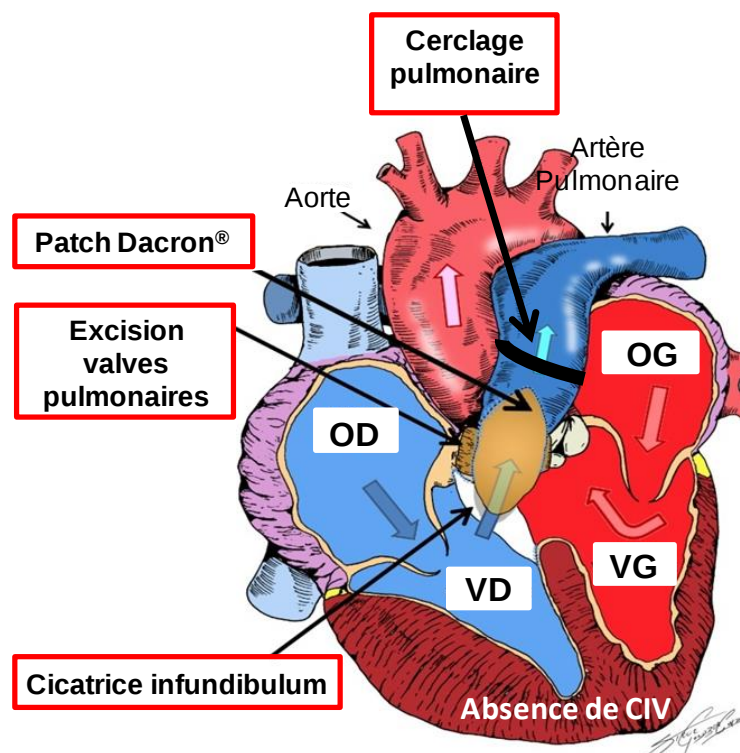


Figure 48. Représentation schématique de la création du modèle rTOF. Une excision de 2 valves pulmonaires est réalisée afin d'induire une fuite pulmonaire. Un patch Dacron® est posé au niveau de l'infundibulum pulmonaire pour reproduire la fibrose cicatricielle, puis un cerclage de l'artère pulmonaire est effectué induisant une sténose pulmonaire. (OD : oreillette droite, OG : oreillette gauche, VD : ventricule droit, VG : ventricule gauche, CIV : communication inter-ventriculaire). Adapté de l'illustration de Steven P. Goldberg, MD.

Les animaux contrôles (sham) ont uniquement subi une thoracotomie latérale.

Après 23 ± 1 semaines post-chirurgie, les cœurs des animaux rTOF et sham sont utilisés en vue d'une caractérisation de la fonction cardiaque sur le plan électrophysiologique, histologique, cellulaire et moléculaire.

Le modèle rTOF créé est viable avec une mortalité post-chirurgicale limitée (2 animaux sur 26) et reproduit les caractéristiques observées chez les patients opérés de la tétralogie de Fallot (*Thambo et al., 2012*).

3. Caractérisation du modèle par analyse IRM

Les cochons sont intubés puis anesthésiés comme décrit précédemment en vue de caractériser la fonction cardiaque par IRM.

Les cochons sont placés en décubitus dorsal dans un IRM Siemens Magnetom Avento de 1,5 Telsa et un ECG a permis le déclenchement des séquences IRM. Toutes les images sont obtenues en arrêt de fin d'expiration.

Dans un premier temps, des images de localisation ont permis d'ajuster le champ de vision, puis des séquences TrueFISP sont réalisées selon le petit axe du VD et du VG sous apnée manuelle.

Pour les mesures de flux de l'AP, des séquences de contraste de phase sont utilisées sous apnée manuelle avec le plan d'acquisition défini à 1 cm et parallèle au plan de la valvule pulmonaire.

L'analyse des données IRM a été effectuée par un seul utilisateur, le Docteur Stephen GILBERT, avec la suite logicielle Siemens syngo ARGUS. La quantification de la fonction ventriculaire est réalisée par contourage automatique du VG et par contourage manuel du sub-endocarde du VD afin d'en retirer les volumes télédiastoliques, télésystoliques, le volume d'éjection systolique et calculer la fraction d'éjection. Les volumes sont indexés à la surface corporelle (BSA, *Body surface area*) (*Kelley et al., 1973*) pour prendre en compte les différences de taille entre les animaux. La fraction de RP est déterminée à partir des images de phase sur lesquelles la région d'intérêt a été contourée pour permettre la quantification des flux entrant et sortant et en calculer le rapport, exprimé en pourcentage.

II/ Enregistrements de Potentiels d'Action Monophasiques *in vivo*

Les potentiels d'action monophasiques (MAPs, *Monophasic Action Potential*) correspondent à des enregistrements de surface bipolaire de l'activité électrique du cœur. Le premier enregistrement de MAP sur un cœur de mammifère fut réalisé par Jochim en 1935 (*Jochim et al., 1935*).

Il s'agit d'un enregistrement de différence de potentiel entre une région du sub-épicaarde ou du sub-endocarde soumis à la pression d'une électrode, et la région myocardique adjacente. Les électrodes de MAPs sont formées de deux électrodes de chlorure d'argent (Ag) d'un diamètre de 1 à 2 mm (**Figure 49**).

La pression locale exercée sur le myocarde par la première électrode dépolarise un amas de cellules sous-jacentes rendant cette région « électriquement inactive » alors que la deuxième électrode à proximité, est en contact avec une région « électriquement active ». La différence de potentiel entre ces deux électrodes génère ainsi des MAPs.

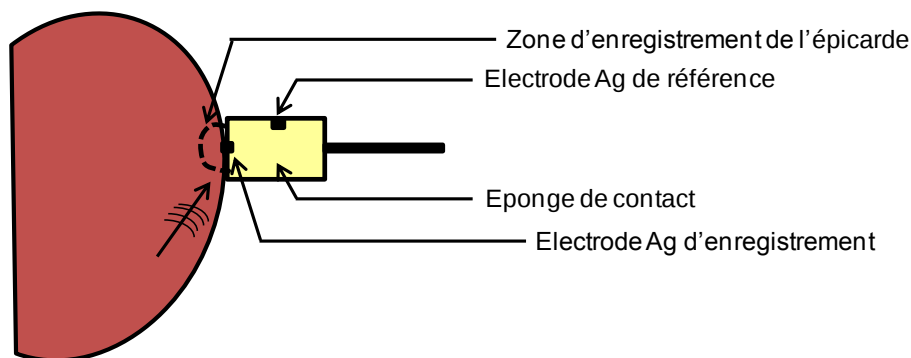


Figure 49. Enregistrement de Potentiel d'Action Monophasique. *In vivo*, les électrodes MAPs sont positionnées sur la surface sub-épicaardique du cœur de l'animal. Une légère pression est réalisée avec une électrode d'enregistrement contre le myocarde afin de dépolariser une petite zone de cardiomyocytes (zone en pointillée). L'électrode de référence est en contact par l'intermédiaire d'une éponge avec la région tissulaire non dépolarisée. Les MAPs enregistrées correspondent à la différence de potentiel entre les deux électrodes lorsque l'onde électrique se propage à proximité de la zone d'enregistrement.

Les enregistrements de MAPs reproduisent le déroulement temporel du potentiel transmembranaire (*Franz, 1999; Ino et al., 1988*). Cette technique permet d'étudier localement les caractéristiques électrophysiologiques du myocarde et notamment la repolarisation (*Franz et al., 1987*).

Plusieurs enregistrements de MAPs sont réalisés selon la méthode décrite par Franz (*Franz, 1999*) *in vivo* en rythme sinusal sur cinq cochons sains anesthésiés. Les électrodes de MAPs sont placées sur le sub-épicaarde au niveau de l'infundibulum pulmonaire

(RVOT) et de la paroi libre du VD. Ils sont effectués avec un système d'acquisition électrophysiologique clinique (BARD®) et analysés avec le logiciel LabChart®.

Les MAPs sont analysés à 20% (MAPD₂₀) et 80% (MAPD₈₀) du temps de repolarisation pour chaque site d'enregistrement (RVOT et VD) et pour chaque animal (**Figure 50**).

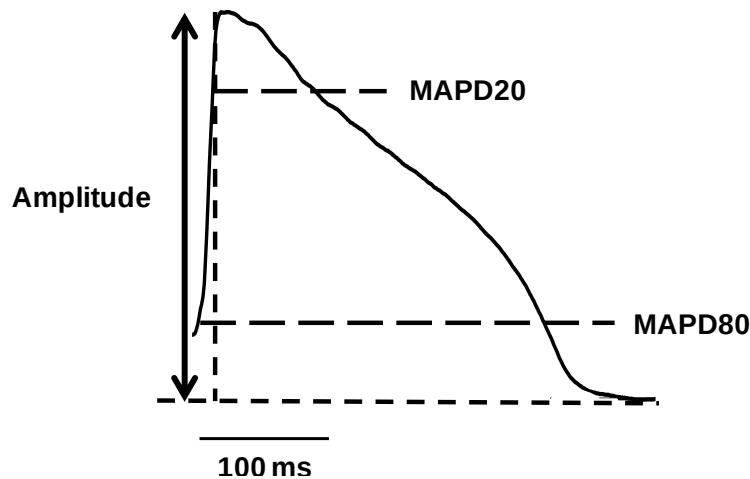


Figure 50. Analyse de Potentiel d'Action Monophasique. Les potentiels d'action monophasiques (MAPs) sont analysés à 20% (MAPD₂₀) et 80% (MAPD₈₀) de repolarisation à partir de l'amplitude maximale.

III/ Techniques d'isolement et de perfusion du tissu cardiaque

Les cochons sont euthanasiés par injection d'une dose létale de pentobarbital (10 mL d'une solution stock de 200 mg/mL).

Le cœur est ensuite rapidement excisé puis canulé au niveau de l'aorte afin d'être rétro-perfusé par une solution froide de cardioplégie composée (en mM) : 110 NaCl ; 1,2 CaCl₂ ; 16 KCl ; 16 MgCl₂ ; 10 NaHCO₃ ; 9,1 glucose supplémentée d'héparine (200 UI/L). Le volume de solution de cardioplégie utilisé est d'environ 200 mL permettant ainsi de laver le cœur et le réseau coronaire du sang résiduel. Cette solution provoque un arrêt électromécanique du cœur grâce à la forte concentration en ions K⁺ qui rend le myocarde inexcitable et réduit ainsi la consommation en O₂ du myocarde.

1. Cœur entier

Le modèle de cœur entier isolé et perfusé fut décrit pour la première fois par Oscar Langendorff en 1895. Il permet de recréer un circuit normal de contraction cardiaque sans l'influence du système nerveux autonome. Le cœur est donc placé dans une chambre

MATÉRIEL ET MÉTHODES

expérimentale contenant une solution de Krebs-Henseleit composée (en mM) : 130 NaCl ; 1,8 CaCl₂ ; 24 NaHCO₃ ; 4 KCl ; 1 MgCl₂ ; 5,6 glucose ; 1,2 NaH₂PO₄ à 37°C, pH 7,4 et soumise à une oxygénation (95% d'O₂ et 5% de CO₂). Le cœur est ensuite perfusé avec cette solution de façon rétrograde par l'aorte avec un débit constant de 100 mL/min.

2. Préparations ventriculaires

La préparation de ventricules (VD et VG) isolés nécessite une dissection minutieuse du cœur dans la solution de cardioplégie. Premièrement, une incision est réalisée le long de l'OD suivant le petit axe du cœur. Une seconde incision est effectuée au niveau de l'AP en descendant vers le VD et le long du septum inter-ventriculaire antérieur jusqu'à l'apex du cœur. Pour terminer, une dernière incision est faite dans l'OG avant de descendre jusqu'à l'apex du VG postérieur, puis le septum inter-ventriculaire est coupé de l'apex jusqu'à la base du cœur. La séparation complète des ventricules s'effectue après une dernière incision dans l'aorte en prenant soin de conserver l'ostium de la coronaire gauche sur la préparation VG et la droite sur la préparation VD. La préparation VG utilisée dans cette thèse est limitée à la partie antérieure du VG ou plus précisément au territoire de perfusion de l'IVA (Figure 51).

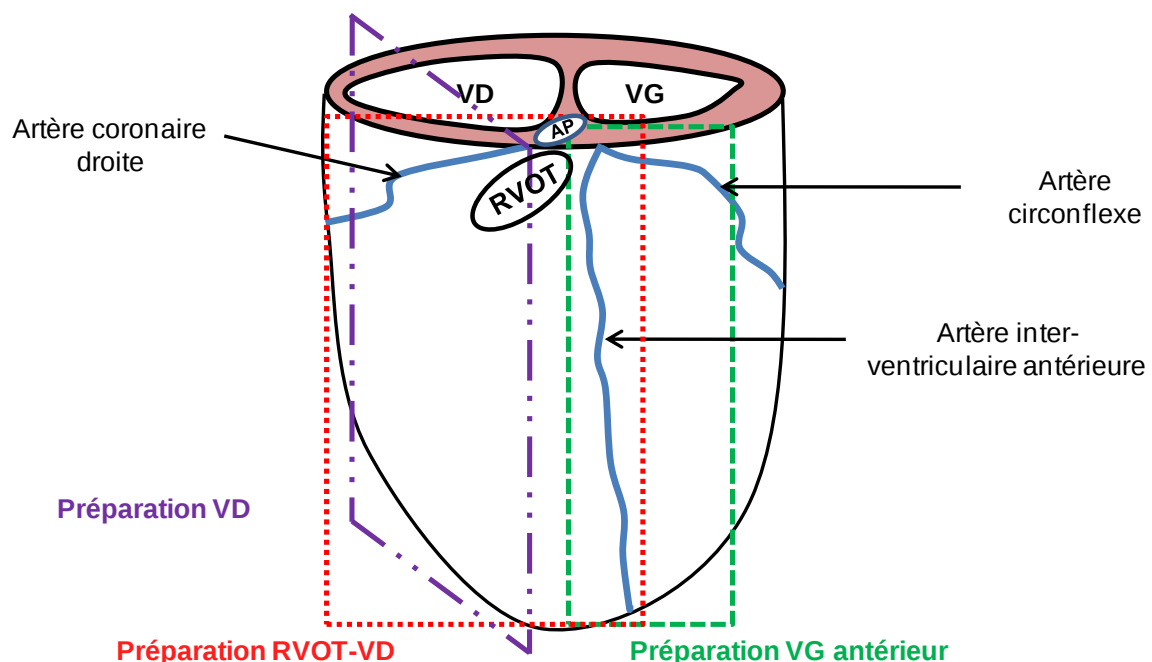


Figure 51. Représentation schématique des différentes préparations ventriculaires. Les trois préparations sont représentées schématiquement sur le cœur avec la préparation ventriculaire du VD (en violet), du VG antérieur (en vert) et du RVOT-VD (en rouge).

Afin de caractériser l'infundibulum pulmonaire (RVOT), un autre modèle de dissection du VD est réalisé. En effet, une double perfusion est nécessaire pour la préparation RVOT-VD car le RVOT est une région vascularisée par les artères coronaires collatérales issues de l'artère coronaire droite et de l'IVA. Pour cela, les oreillettes gauche et droite sont ouvertes longitudinalement (incision parallèle au petit axe du cœur) pour permettre un accès aux ventricules. Une première incision ventriculaire est effectuée de la base à l'apex au niveau du VG antérieur en longeant le septum inter-ventriculaire et l'IVA. La seconde incision ventriculaire est effectuée au niveau du VD postérieur toujours de la base vers l'apex et le long du septum inter-ventriculaire postérieur. La dernière incision consiste à couper le septum inter-ventriculaire en remontant de l'apex à la base pour libérer la préparation RVOT-VD tout en prenant soin de conserver la base de l'aorte et les ostia des deux coronaires sur celle-ci (**Figure 51**).

Une fois la dissection des ventricules réalisée, le VG antérieur et le VD sont isolés puis pesés. Par la suite, le VG antérieur et le VD sont canulés respectivement par l'IVA et par l'artère coronaire droite. La préparation RVOT-VD est canulée par ces deux artères coronaires décrites ci dessus.

Les coronaires découpées lors de la dissection sont ligaturées sur chaque préparation afin d'obtenir une perfusion uniforme au sein des ventricules. Les ligatures des coronaires du VG antérieur, VD et de la préparation RVOT-VD se font sous perfusion d'une solution de cardioplégie présente dans une colonne de perfusion à une pression d'environ 80 mmHg.

La taille des préparations sont les suivantes : VG antérieur (généralement 10 x 6 cm et une épaisseur de 1-2 cm), VD (10 x 8 cm) et RVOT-VD (9 x 10 cm). Ensuite, les préparations ventriculaires sont montées sur un cadre et légèrement tendues pour exposer le myocarde, puis placées dans une chambre expérimentale transparente en PVC (**Figure 52**).

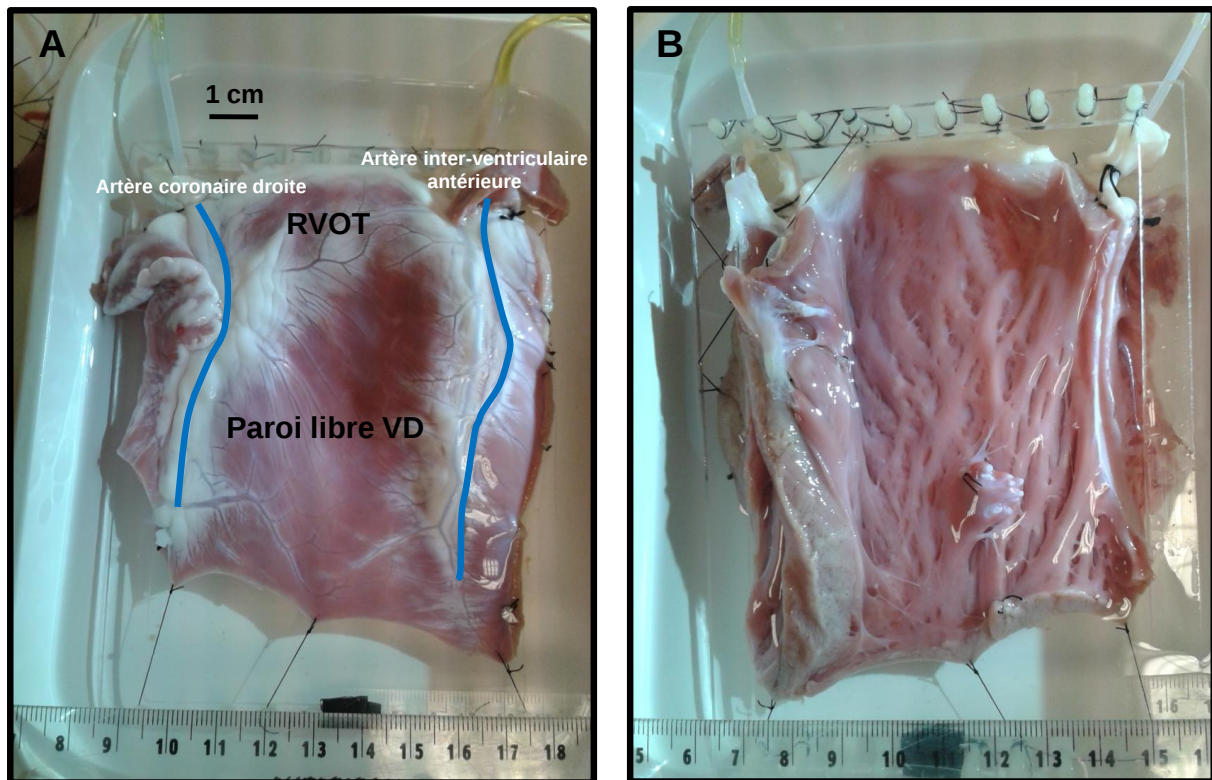


Figure 52. Préparation RVOT-VD. Préparation du RVOT-VD côté sub-épiqueardique (A) avec la double perfusion par l'artère coronaire droite et l'IVA. Préparation du RVOT-VD côté sub-endocarde (B). La préparation est montée puis tendue sur un cadre transparent.

Les préparations ventriculaires sont perfusées par la solution de Krebs-Henseleit modifiée dans un système Langendorff. La perfusion se fait avec un débit constant, soit 20 mL/min pour les préparations VG antérieur et VD et 40 mL/min pour la préparation RVOT-VD. La solution de Krebs-Henseleit modifiée est distribuée dans un circuit fermé en recirculation à l'ensemble du système de perfusion à partir d'un réservoir de 2 L. Elle reproduit les concentrations ioniques physiologiques présentes dans l'organisme, permettant au ventricule de se contracter à nouveau.

La température de la solution à la canule et dans la chambre expérimentale est maintenue à $37 \pm 1^\circ\text{C}$. Du carbogène (95% d' O_2 et 5% de CO_2) est délivré tout au long des expérimentations par des oxygénateurs placés dans le réservoir de solution afin de maintenir le pH à 7,4.

IV/ Enregistrements de Potentiels d'Action optiques *ex vivo* : la cartographie optique

1. Généralités

Jusque dans les années 60, la microélectrode était la technique de choix pour l'étude des courants électriques au niveau cellulaire et tissulaire. Elle permettait ainsi d'étudier les variations de potentiel de membrane sur un site donné. Cependant, à l'échelle de l'organe, la technique de la microélectrode ne permet pas de cartographier à une haute résolution l'activation et la repolarisation cardiaque, et donc l'obtention d'informations concernant l'hétérogénéité des propriétés électriques. De plus, elle ne garantit pas la possibilité de retrouver les vitesses de conduction.

De ce fait, afin de pouvoir visualiser l'ensemble de l'activité électrique sur la totalité de l'organe, une nouvelle technique par fluorescence se développa d'abord en neurosciences (*Cohen et al., 1968*).

Dans le domaine de la cardiologie, il faudra attendre la fin des années 70 pour que les premiers enregistrements électrophysiologiques par fluorescence appelés cartographie optique soient réalisés sur un cœur de grenouille (*Salama and Morad, 1976*).

La cartographie optique permet d'étudier l'activité électrique d'un tissu entier avec une haute résolution spatiale (submillimétrique) et une haute résolution temporelle (en milliseconde) grâce à une sonde fluorescente sensible aux variations de potentiel de membrane. Il est donc possible de cartographier au sein du tissu, la phase de dépolarisation et de repolarisation ainsi que les APDs et les vitesses de propagation de l'onde électrique, afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'activité électrique cardiaque (*Efimov et al., 2004*). Toutefois, l'enregistrement obtenu ne représente que le décours temporel du PA et non la valeur absolue du potentiel membranaire car il s'agit de mesures non-calibrées.

Le choix des sondes potentiométriques est limité par les phénomènes de photo-blanchiment et de photo-toxicité. De plus, la sonde choisie doit avoir un bon rapport signal sur bruit pour l'obtention d'un enregistrement.

Cependant, cette technique ne permet pas de cartographier l'onde électrique dans les couches profondes du tissu de par la dispersion et l'absorption des photons dans le tissu. Seuls les potentiels transmembranaires des couches cellulaires superficielles et des couches cellulaires d'une profondeur de 300 à 500 μm sont détectés (*Knisley, 1995*). Afin de répondre à ce

MATÉRIEL ET MÉTHODES

problème, il existe des fibres optiques qui peuvent s'insérer dans le tissu, exciter la sonde et collecter la fluorescence émise par les cellules en profondeur (*Hooks et al., 2001*). La méthode dite de transillumination consistant à illuminer une face de l'organe et recueillir la fluorescence sur la phase opposée peut être également une alternative à ce problème (*Baxter et al., 2001*). Plus récemment, des techniques utilisant différentes longueurs d'onde ont été développées afin d'enregistrer l'activité électrique dans le tissu profond (*Walton et al., 2010*). L'apport de la cartographie optique dans la compréhension de la genèse des arythmies est considérable (*Gray et al., 1995*). Ainsi, des études furent réalisées sur des modèles de TV (*Girouard et al., 1996*), de FV (*Valderrabano et al., 2001*) et de FA (*Berenfeld et al., 2011*).

2. Sondes sensibles au potentiel membranaire

Ces dernières années, plusieurs sondes dérivées du styrylpyridinium se sont développées et possèdent la capacité d'être sensible au potentiel membranaire (**Tableau 3**).

Nom	Formule chimique	Excitation (nm)	Emission (nm)	Structure
Di-4-ANEPPS	$C_{28}H_{36}N_2O_3S$	496	705	
Di-8-ANEPPS	$C_{36}H_{52}N_2O_3S$	496	631	
RH421	$C_{29}H_{42}N_2O_3S$	515	704	
RH795	$C_{26}H_{39}Br_2N_3O_2$	530	712	
JPW-1063	$C_{33}H_{49}Br_2N_3$	540	695	
Di-2-ANEPEQ (JPW 1114)	$C_{26}H_{35}Br_2N_3$	517	721	

Tableau 3. Liste non exhaustive de sondes potentiométriques dérivées du styrylpyridinium. Il est représenté pour chaque sonde sa formule chimique, sa longueur d'onde d'excitation et d'émission (en nm) ainsi que sa structure chimique. *Adapté de (Rosenbaum and Jalife, 2001).*

Ces sondes possèdent un groupement aliphatique qui leur confère la particularité de s'insérer entre les chaînes d'acides gras de la membrane des cardiomyocytes de façon à avoir le chromophore situé juste au-dessous des têtes polaires des phospholipides, perpendiculaire à la surface membranaire. De plus, la présence d'un groupement sulfonique

évite l'internalisation de la sonde dans la cellule permettant ainsi une utilisation prolongée de celle-ci.

Ces sondes sont sensibles à la variation du potentiel de membrane par un mécanisme d'électrochromisme (*Gross et al., 1994*). De ce fait, une variation du potentiel transmembranaire se traduit par un shift du spectre de fluorescence.

Par définition, la fluorescence correspond à l'émission de lumière d'une molécule fluorescente appelée fluorophore ou fluorochrome, exposée à une source lumineuse d'une certaine longueur d'onde. Cette molécule fluorescente exposée à la lumière possède un électron qui va absorber l'énergie lumineuse et passer à un état dit « excité » correspondant à un état énergétique supérieur. A cet état, l'électron devient instable et retourne rapidement ($<10^{-8}$ s) à son état énergétique d'origine, plus stable, en perdant de l'énergie sous forme de lumière et de chaleur.

D'après la Loi de Stoke, une partie de l'énergie émise par la molécule fluorescente est perdue sous forme de chaleur. Ainsi, la lumière émise par cette dernière contient moins d'énergie que la lumière absorbée. C'est pourquoi la lumière émise, a une longueur d'onde plus grande que la lumière d'excitation.

Durant ce projet de thèse la sonde di-4-ANEPPS est utilisée pour la caractérisation électrophysiologique du tissu cardiaque en cartographie optique (*Loew et al., 1992*) (**Figure 53A**). Cette sonde est caractérisée par un pic du spectre d'absorption à 469 nm et un pic du spectre d'émission à 620 nm (*Fluhler et al., 1985*). La dépolarisation de la membrane des cellules provoque un changement de conformation de la sonde fluorescente (**Figure 53A**) induisant un déplacement du spectre d'émission du chromophore (ΔF) vers les longueurs d'onde caractéristiques du bleu. Inversement, la repolarisation induit un déplacement du spectre d'émission (ΔF) vers les longueurs d'onde caractéristiques du rouge. La variation de fluorescence (ΔF) obtenue est normalisée à la fluorescence de base du tissu (F). Ainsi le ratio $\Delta F/F$ correspond au PA optique (**Figure 53B**).

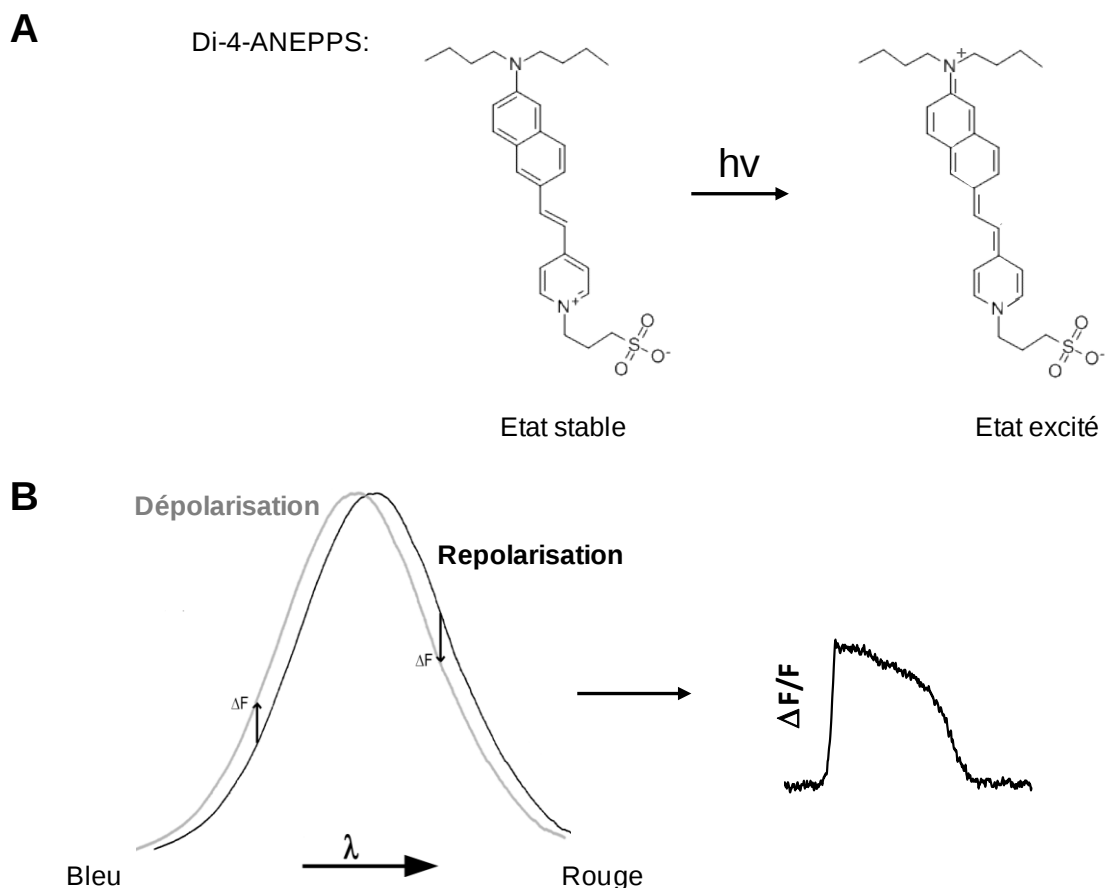


Figure 53. Sonde sensible au potentiel de membrane. Structure de la sonde di-4-ANEPPS dans son état stable et excité (A). La dépolarisation de la membrane induit un déplacement du spectre d'émission de la sonde dépendant du potentiel produisant ainsi un PA optique (B). *Adapté de (Rosenbaum and Jalife, 2001).*

Le choix de la sonde dépend du rapport $\Delta F/F$ et du rapport signal sur bruit obtenus. Afin de limiter les effets liés à l'autofluorescence du tissu et au photo-blanchiment de la sonde, il est conseillé de choisir une sonde avec un ratio $\Delta F/F$ élevé (Attin and Clusin, 2009).

La réponse du di-4-ANEPPS au changement de potentiel membranaire est très rapide, de l'ordre de la μs . Il est également noté que le changement de l'intensité de fluorescence est de 8-10% par 100 mV.

3. Dispositif expérimental

Une fois le tissu cardiaque (cœur entier, préparations ventriculaires) placé dans la chambre expérimentale, deux électrodes sont positionnées à la base et à l'apex du tissu. Une dernière électrode dite de référence, est mise également dans la chambre. Ces trois électrodes permettent de visualiser un pseudo-ECG sur l'oscilloscope afin de suivre l'activité électrique du tissu cardiaque perfusé.

Deux électrodes en tungstène sont positionnées au niveau de la région sub-épicaudique ou sub-endocardique. Elles permettent une stimulation bipolaire du tissu à la fréquence de 2 Hz afin de stabiliser le rythme des ventricules ou du cœur perfusés.

Les contractions du myocarde observées lors de la perfusion peuvent créer des artéfacts de mouvement lors de l'acquisition de PA en cartographie optique. De ce fait, les contractions sont arrêtées grâce à l'utilisation d'un découpleur électromécanique : la blebbistatin (1-phenyl-1, 2, 3, 4-tetrahydro-4-hydroxypyrrôle [2, 3-b]-7-méthylquinolin-4-one) à une concentration de 10 μM (Enzo Life-Science). Il s'agit d'une molécule qui inhibe l'activité ATPasique des têtes de myosine, maintenant ainsi la myosine dans un état détaché de l'actine (*Allingham et al., 2005*).

Cette molécule ne provoque pas ou peu d'effets sur l'activité électrique du cœur : ECG, période réfractaire ventriculaire et auriculaire (*Fedorov et al., 2007*) et sur les APDs (*Lou et al., 2012*). Contrairement à un autre agent découpleur de l'activité électromécanique soit le 2, 3-butanedione monoxime (BDM), la blebbistatin ne modifie pas les VC (*Kettlewell et al., 2004*) ni les courants ioniques potassiques et calciques (*Ferreira et al., 1997*). La blebbistatin est néanmoins photosensible, et est administrée à l'obscurité en bolus par l'intermédiaire d'une seringue au niveau de la canule de perfusion (*Kolega, 2004; Swift et al., 2012*).

La sonde fluorescente, le di-4-ANEPPS (10 μM Biotium) est également administrée en bolus (5 mL) dans le milieu de perfusion à l'obscurité afin d'éviter le photo-blanchiment de la sonde.

La sonde est alors excitée par l'intermédiaire de LEDs à 530 nm (CAIRN Research) positionnées de chaque côté de la préparation ventriculaire ou de cœurs entiers perfusés. Les signaux fluorescents émis par le sub-épicaudique pour les cœurs entiers ou les régions du sub-épi- et du sub-endocarde pour les préparations ventriculaires, sont séparés du reste de la lumière par un filtre passe-bande de 650 ± 50 nm. Puis ces signaux sont enregistrés grâce à deux caméras MiCam Ultima CMOS (SciMedia USA) à une résolution spatiale de l'ordre du millimètre et une résolution temporelle de 1 kHz. Pour les cœurs entiers, une caméra est placée côté antérieur du cœur alors que pour les préparations ventriculaires, une caméra a permis la cartographie du sub-épicaudique et la seconde du sub-endocarde.

Les signaux fluorescents obtenus sont amplifiés, numérisés et visualisés durant l'expérimentation à l'aide du logiciel Brainvision® (**Figures 54 et 55**).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

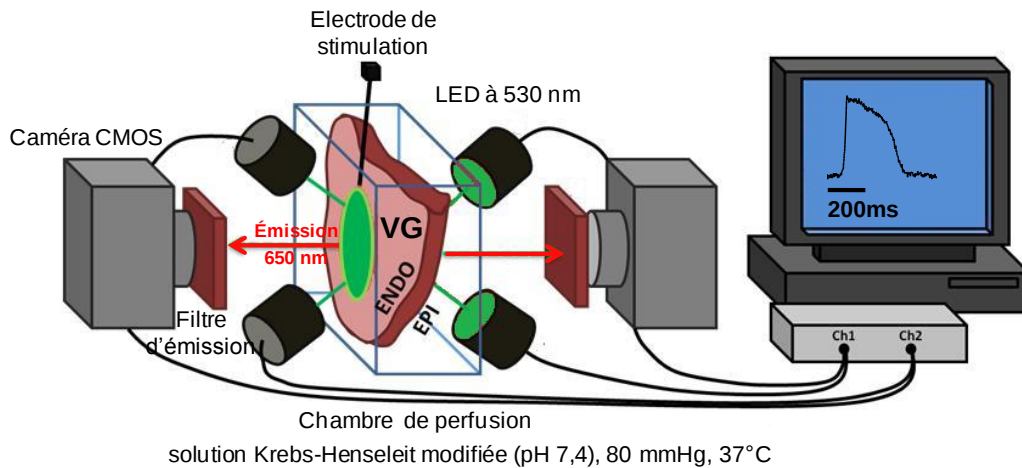


Figure 54. Représentation schématique de la cartographie optique. Le ventricule est perfusé dans une chambre expérimentale maintenue à 37°C. Une électrode de stimulation est placée sur le ventricule afin de le stimuler. La sonde di-4-ANEPPS sensible au potentiel de membrane est excitée par les LEDs à 530 nm, la fluorescence émise est collectée à 650 ± 50 nm par une caméra CMOS.

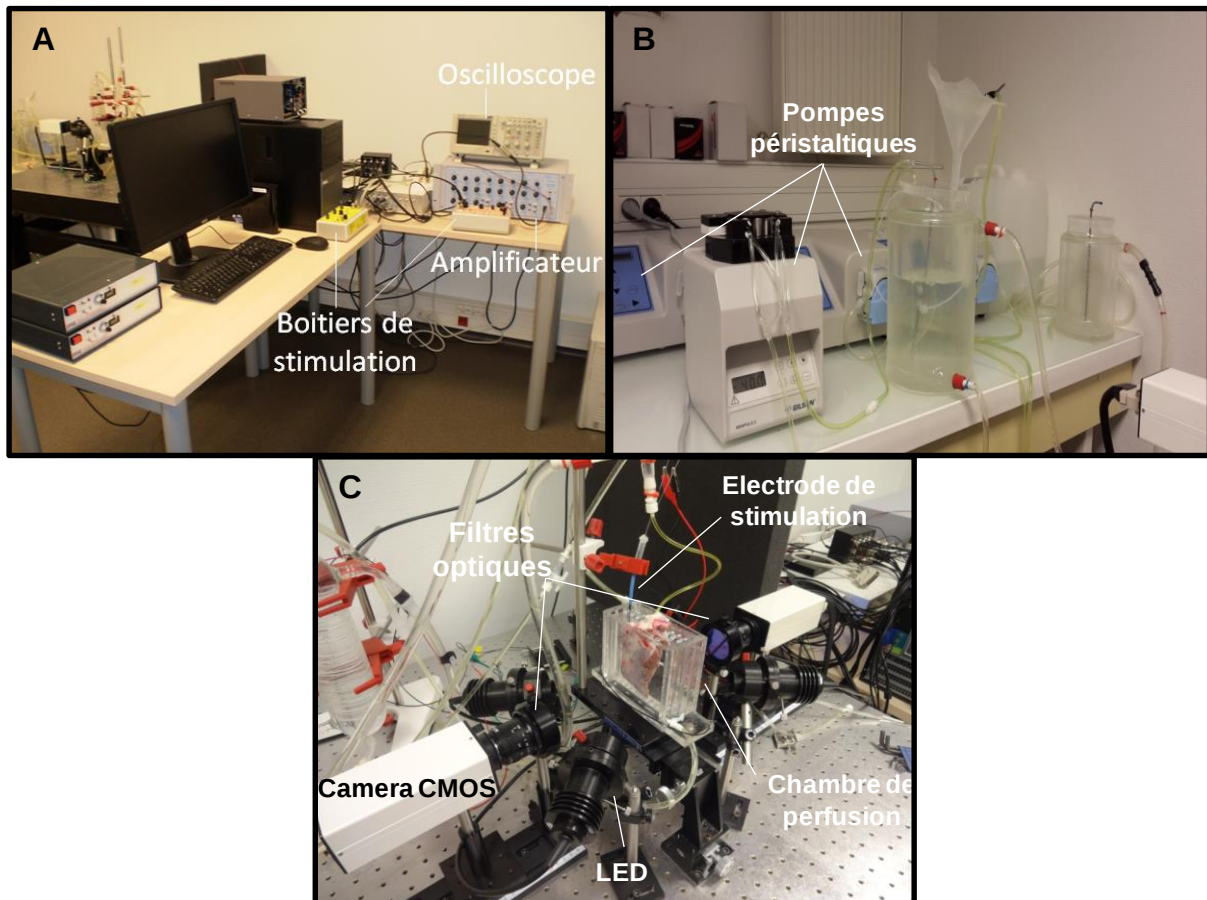


Figure 55. Photographies du dispositif de cartographie optique utilisé en laboratoire. Dispositifs de stimulation, et d'acquisition des enregistrements de PAs optiques (A). Représentation des pompes péristaltiques d'alimentation de la chambre expérimentale et de perfusion du tissu cardiaque (B). Dispositif représentant la chambre expérimentale, les LEDs, les caméras et les filtres optiques (C).

4. Protocoles expérimentaux

a) Protocole de restitution

Un protocole de restitution standard visant à stimuler le tissu cardiaque est réalisé par l'intermédiaire d'une électrode bipolaire.

La gamme des fréquences de stimulation s'échelonne entre 1 et 5 Hz avec une incrémentation de 0,5 Hz.

Plusieurs sites de stimulation sont réalisés en fonction du tissu cardiaque et sont résumés dans le schéma ci-dessous (**Figure 56**). Chaque site de stimulation représenté par une pastille noire est effectué au niveau des couches sub-épicaudiques et sub-endocardiques. Il en est de même pour les zones de mesure (carrés jaunes) qui se font sur les deux couches du myocarde.

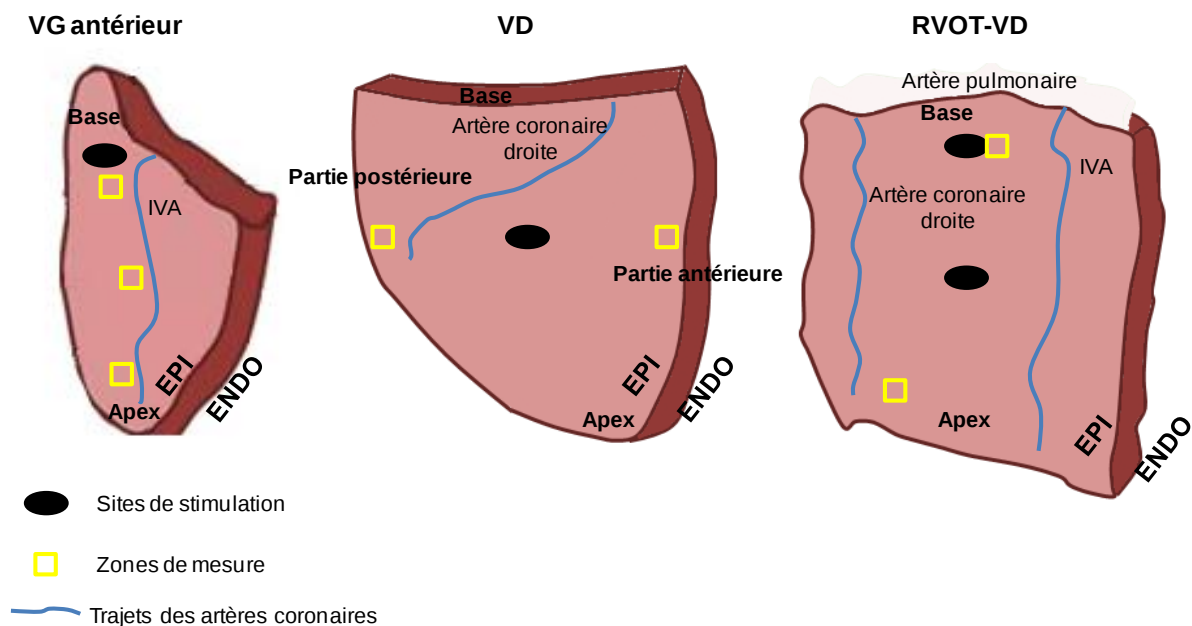


Figure 56. Sites de stimulation et d'enregistrement des potentiels d'action optiques en fonction du type de tissu cardiaque. Sur cette figure, il est représenté uniquement les sites de stimulation (pastilles noires) sub-épicaudiques. Notons que les sites de stimulation équivalents sur la face sub-endocardique sont également effectués aux mêmes localisations c'est-à-dire la base du VG antérieur, la paroi libre du VD et au niveau du RVOT. Les zones de mesures sont réalisées au niveau des deux couches myocardiques de la base, de la paroi libre et de l'apex du VG antérieur. Concernant la préparation VD, les mesures sont faites au niveau de la partie antérieure et postérieure du VD. Pour la préparation RVOT-VD, les mesures sont effectuées au niveau du RVOT et de la paroi libre du VD.

Concernant les préparations de cœurs entiers, l'enregistrement des PAs optiques s'effectue au niveau du sub-épicaudique du RVOT et de la paroi libre du VD en rythme sinusal uniquement.

b) Protocole S1-S2

Le protocole S1-S2 permet de déterminer la PRE. On effectue 10 stimulations (S1) de 5 ms chacune et espacées de 500 ms à la base du VG antérieur. Une dernière stimulation (S2) de 5 ms est appliquée en diminuant graduellement l'intervalle de couplage S1-S2 de 50 ms puis de 10 ms pour déterminer la PRE. Le premier intervalle de couplage S1-S2 pour lequel aucun PA n'est généré correspond à la PRE.

5. Analyses des données

Les signaux fluorescents sont prétraités par le logiciel BraviAna de Brainvision[®]. Dans un premier temps, les signaux sont normalisés à 25% de la $\Delta F/F$. Puis un filtre spatial et un filtre cubique moyennant 3 pixels par 3 sont appliqués sur les signaux.

Les APDs sont déterminés comme étant la différence entre le temps d'activation et le temps de repolarisation. Ils sont mesurés à 20% (APD₂₀) et 80% (APD₈₀) de repolarisation à partir de la dF/dT max des PAs et sont analysés sur une région de 5 x 5 mm (**Figure 56**).

Le temps d'activation total sub-épiqueur ou sub-endocardique est calculé à partir de la différence de temps entre le début et la fin de l'activation sur la totalité de la surface sub-épiqueur (ou sub-endocardique).

La dispersion du temps de repolarisation est évaluée à partir de la différence entre le temps de repolarisation le plus précoce et le plus tardif pour toutes les faces épiqueures et endocardiques.

Le gradient transmural de l'APD₈₀ (APD₈₀ ENDO-EPI) représente la différence entre l'APD₈₀ enregistré au niveau du sub-endocarde avec celui enregistré au niveau du sub-épica pour une même région donnée. Le gradient antéro-postérieur de l'APD₈₀ (APD₈₀ POST-ANT) correspond à la différence de l'APD₈₀ enregistré entre le sub-épica (ou sub-endocarde) postérieur et le sub-épica (ou sub-endocarde) antérieur de la préparation ventriculaire. Le gradient inter-ventriculaire sub-épiqueur (ou sub-endocardique) représente la différence de l'APD₈₀ entre le VD postérieur et le VD antérieur ou VG antérieur (APD₈₀ EPI/ENDO VD post - APD₈₀ EPI/ENDO VD ant/VG ant).

La dispersion globale des APD₈₀ est calculée à partir de la différence du 95^{ème} et 5^{ème} centiles de la distribution de l'APD₈₀ sur la globalité de la surface cartographiée.

Afin de mesurer les VC, des cartes d'activation sont réalisées à partir de 50% de la dépolarisation des PAs optiques (50% de $V_{max}-V_{min}$) avec un intervalle de 5 ms pour les

isochrones qui relient les pixels possédant le même temps d'activation. Les vitesses longitudinales (V_L) et transverses (V_T) sont mesurées à partir de l'origine de l'onde de dépolarisation.

Les arythmies survenant lors des protocoles de stimulation ont été quantifiées et leurs fréquences dominantes analysées par transformée de Fourier afin de calculer un index de régularité (RI, *Regularity index*) correspondant à la puissance de la fréquence dominante divisé par la puissance totale.

V/ Isolement des cardiomyocytes ventriculaires

La préparation RVOT-VD doublement canulée est perfusée par l'artère coronaire droite et l'IVA avec un flux constant de 40 mL/min. La préparation est perfusée par 2 solutions successives oxygénées et chauffées à 37°C afin de maintenir des conditions physiologiques viables pour le muscle cardiaque (**Figure 57**).

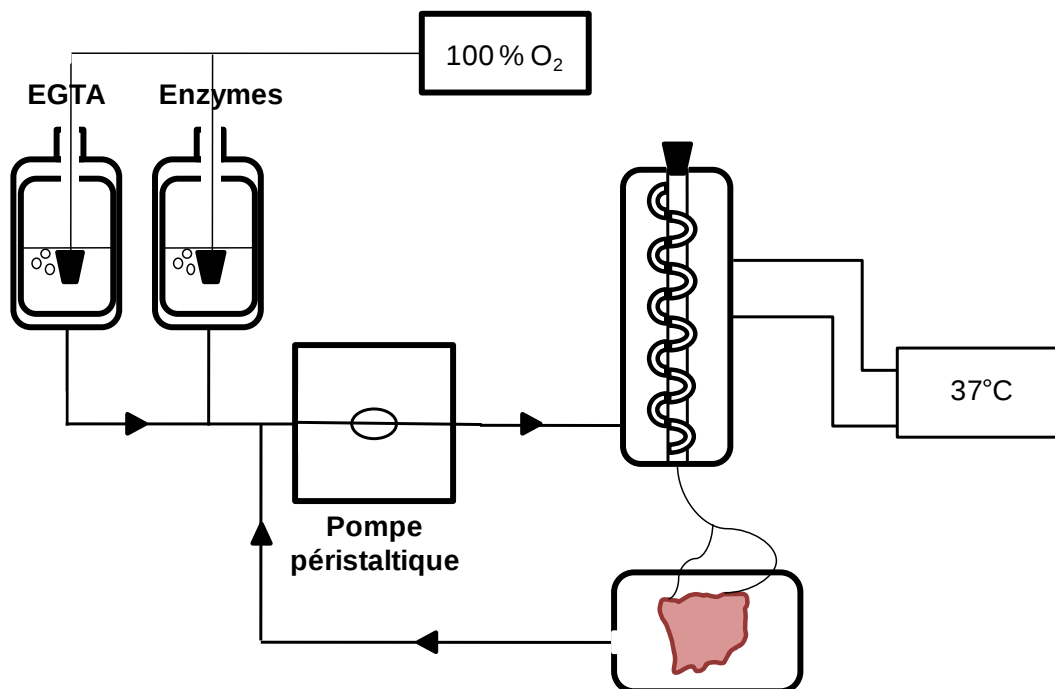


Figure 57. Représentation schématique du système de perfusion rétrograde selon la méthode de Langendorff utilisé pour l'isolation des cardiomyocytes ventriculaires. L'IVA et l'artère coronaire droite sont canulées et perfusées à un flux constant par une pompe péristaltique. L'ensemble des solutions est oxygéné et maintenu à 37°C. La première perfusion est réalisée par une solution tampon HEPES supplémentée d'EGTA afin d'arrêter les contractions. La dernière solution perfusée contient les enzymes pour la dissociation des cardiomyocytes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

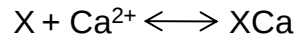
La première solution est une solution tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl) - 1-piperazine ethane sulfonique) d'isolation contenant (en mM) : 130 NaCl ; 5,4 KCl ; 1,4 MgCl₂ ; 0,4 NaH₂PO₄ ; 5 HEPES ; 10 glucose ; 20 taurine ; 10 créatine avec un pH ajusté à 7,4 supplémentée de 0.1mM de Na₂EGTA afin de laver la préparation de son Ca²⁺ et de stopper les contractions durant 8 minutes environ. L'absence de Ca²⁺ va induire une fragilisation des connections intracellulaires. La deuxième perfusion est une solution enzymatique contenant de la collagénase de type II à 385 U/mg (Worthington USA) et des protéases type XIV from Streptomyces (Sigma-Aldrich) qui vont digérer la MEC pendant 18 minutes. Après cette digestion enzymatique, les couches supérieures de tissu provenant du sub-épicaarde et du sub-endocarde du VD, RVOT et VG sont prélevées. Les échantillons sont coupés en petits morceaux puis mis sous agitation dans la solution tampon HEPES d'isolation en présence de collagénases et protéases à 37°C durant 10 à 15 minutes. Après chaque agitation, les cardiomyocytes ventriculaires sont libérés dans la solution enzymatique qui est ensuite filtrée grâce à un filtre en nylon (maille 250 µm) afin de séparer les fragments tissulaires et de les remettre à agiter. La solution filtrée est centrifugée à 800 rpm pendant 1 minute, puis le culot cellulaire est récupéré et resuspendu dans une solution tampon HEPES contenant 20 µM de CaCl₂. Le retour calcique est réalisé par la suspension des cellules dans des solutions tampon HEPES de 100 ; 400 µM puis 0,75 mM de CaCl₂. Les myocytes sont conservés dans des tubes eppendorfs à l'horizontale à température ambiante (20°C) et pourront être utilisés durant 8 heures.

VI/ Mesure simultanée du calcium et de la contraction cellulaire

1. Sonde calcique

La sonde calcique permet de réaliser des mesures dynamiques de la concentration en Ca²⁺ libre. La sonde est constituée d'une partie capable de fixer de manière spécifique un ou plusieurs ions Ca²⁺ associés à un chromophore. Le chromophore peut faire partie intégrante de la sonde elle-même. Dans le cas de la sonde fluorescente organique, la fixation du Ca²⁺ modifie l'environnement électronique de la molécule, ce qui engendre des changements des propriétés de fluorescence de la sonde. Ceci se traduit par une modification du rendement (augmentation ou diminution), un déplacement du spectre d'excitation ou d'émission de la molécule.

La réaction de liaison d'une sonde X au Ca^{2+} est la suivante :



A l'équilibre, la constante de dissociation (K_d) est définie par :

$$K_d = \frac{[\text{X}] \times [\text{Ca}]}{[\text{XCa}]}$$

$[\text{X}]$ et $[\text{Ca}]$ sont les concentrations libres en sonde et en calcium et $[\text{XCa}]$ est la concentration du complexe.

Dans les années 80, les premières sondes fluorescentes apparaissent. La première sonde synthétisée est le Quin-2. Elle se compose d'un chélateur calcique tel que l'EGTA (acide ethylene diamine tétraacétique) ou le BAPTA (acide bis-O-aminophénoxy-éthane-N, N, N', N'-tétraacétique) associée à un fluorophore. Pour des mesures optimales, l'affinité de liaison de la sonde pour le Ca^{2+} déterminée par le K_d devrait être du même ordre de grandeur que la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Le Quin-2 possède un K_d de 114 nM. Cette sonde est capable de lier le Ca^{2+} avec une stoechiométrie 1 : 1. La liaison du Ca^{2+} provoque une variation de l'intensité de fluorescence émise par la sonde. Les variations du signal fluorescent correspondent aux variations réelles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Cependant, cette sonde a été abandonnée à cause de son faible rendement quantique. En effet, il faut une forte concentration de la sonde pour obtenir un signal détectable. De ce fait, sur le modèle du Quin-2, d'autres sondes furent synthétisées telles que le Fura-2 et l'Indo-1 qui dérivent également des chélateurs de Ca^{2+} (EGTA, BAPTA).

Au cours de ces travaux de thèse, la sonde Fura-2-AM (Fura-2 acetoxymethylester) est utilisée (**Figure 58A**). Le groupement acetoxymethylester (AM) rend la sonde Fura-2 perméante à la membrane cellulaire en masquant les charges négatives des groupements carboxyl de la molécule. La sonde Fura-2-AM hydrophobe et lipophile traverse le sarcolemme et pénètre dans le cytoplasme du cardiomyocyte. Dans la cellule, la sonde subit l'action d'estérases endogènes clivant le groupement AM, libérant ainsi la forme carboxylée du Fura-2 qui pourra se lier au Ca^{2+} (**Figure 58B**). Il s'agit d'une sonde ratiométrique à double excitation et mono émission. L'émission de la fluorescence du Fura-2 à 510 nm obtenue en réponse à une excitation à 340 nm (F_{340}) et 380 nm (F_{380}) en présence et en absence de Ca^{2+} se traduit par une augmentation de F_{340} et une diminution de F_{380} (**Figure 58C**). La liaison du Ca^{2+} à la sonde Fura-2 entraîne non seulement une modification de l'environnement électronique mais aussi un changement des propriétés de fluorescence avec

MATÉRIEL ET MÉTHODES

un déplacement du spectre d'excitation du Fura-2. La mesure du rapport de fluorescence (F_{340}/F_{380}) permet de calculer un index de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} . Fura-2 possède un K_d de 0,14 μM . Cette sonde possède un fort rendement quantique ce qui en fait une molécule de choix pour réaliser de l'imagerie calcique sur cellule unique.

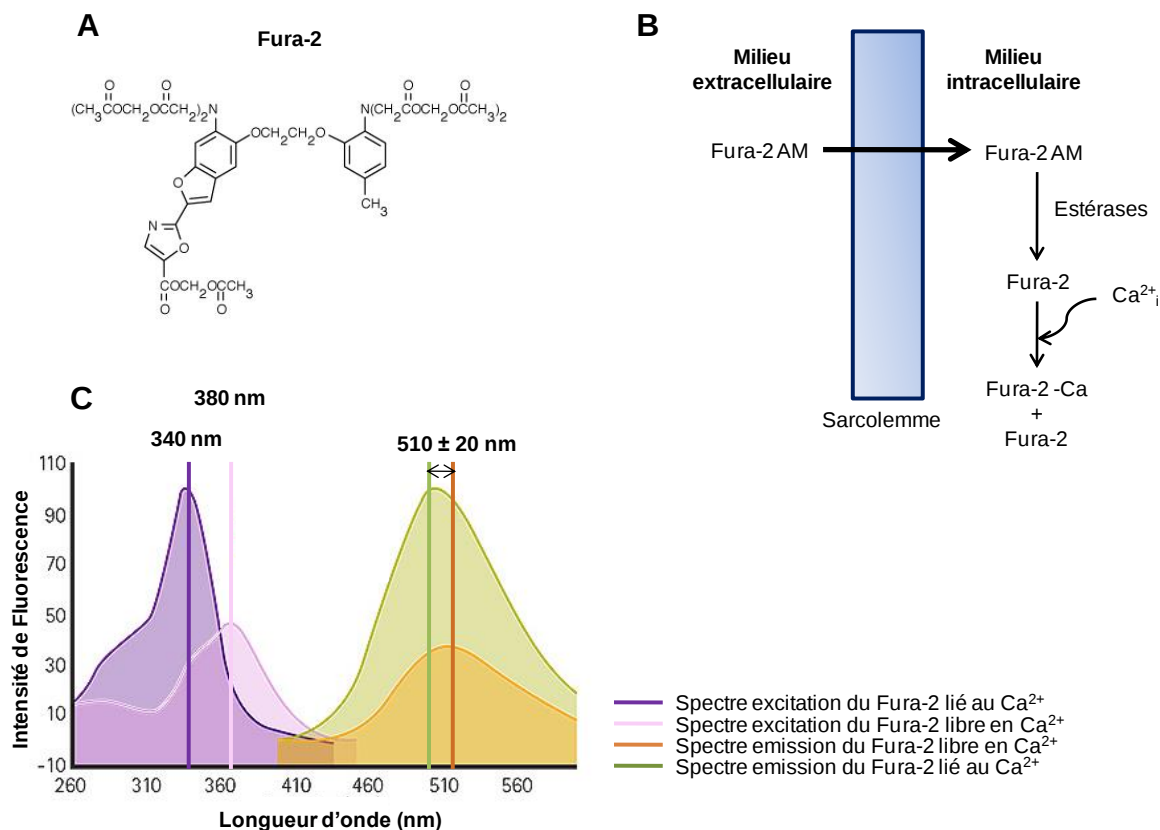


Figure 58. Structure et propriétés de la sonde Fura-2. Structure de la sonde Fura-2 sous la forme AM. Elle possède une structure proche du chélateur de calcium, l'EGTA (A). La sonde pénètre dans la cellule sous la forme AM lipophile. Dans la cellule, les estérases endogènes vont activer la sonde fluorescente c'est-à-dire libérer sa forme acide qui pourra se lier au Ca^{2+} (B). Le Fura-2 est une sonde ratiométrique à double excitation et mono émission. La forme Fura-2 liée au Ca^{2+} possède une absorption maximale à 340 nm et la forme Fura-2 libre en Ca^{2+} a une absorption maximale à 380 nm. Le pic d'émission se situe vers 510 nm. La fluorescence émise est mesurée à 510 ± 20 nm (C). Adapté du site internet www.Moleculardevices.com.

2. Dispositif et protocoles expérimentaux

La mesure du Ca^{2+} est possible grâce au dispositif de microspectrofluorimétrie décrit dans la **Figure 59**. Les cardiomyocytes sont placés dans une chambre expérimentale sur un microscope inversé à épifluorescence (Nikon Eclipse Ti-U) et sont observés grâce à un objectif X40. Les cellules sont perfusées de manière continue (1 mL/min) avec une solution de Tyrode contenant (en mM) : 137 NaCl ; 5,4 KCl ; 0,33 NaH_2PO_4 ; 0,5 MgCl_2 ; 6 H_2O ; 5 HEPES ; 5,6 Glucose ; 1,8 CaCl_2 avec un pH ajusté à 7,4 par le NaOH. La température de la chambre expérimentale est contrôlée par un contrôleur de température (mTCII, Cell

Microcontrols) à 37°C. Les cardiomyocytes sont stimulés par deux électrodes de platine de part et d'autre de la chambre expérimentale créant un champ électrique. L'amplitude des stimulations est comprise entre 60 et 90 V avec une durée des pulses de 1 à 5 ms. La fréquence de stimulation des cardiomyocytes est de 1 Hz. La mesure du Ca^{2+} se fait simultanément à celle de la longueur des sarcomères.

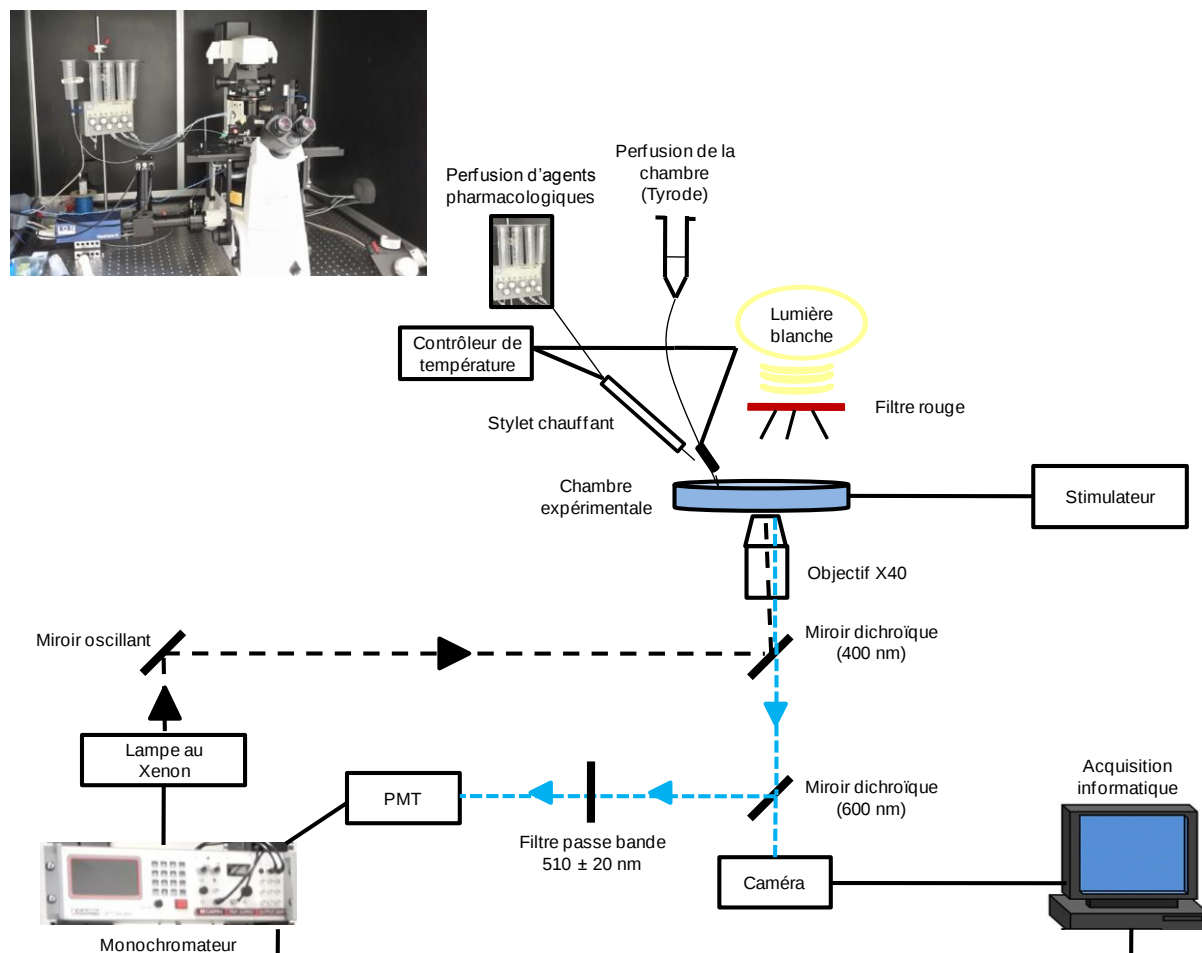


Figure 59. Dispositif expérimental pour la mesure de la fluorescence du Fura-2 et de la contraction cellulaire. Les cardiomyocytes sédimentent dans une chambre expérimentale par gravité perfusée par une solution de Tyrode maintenue à 37°C. Les cellules sont observées grâce à un objectif X40. Elles sont soumises à un champ électrique contrôlé par le boîtier de stimulation. La longueur des sarcomères des cellules est suivie par logiciel sur l'image provenant de la caméra. La lampe Xénon et le miroir oscillant sont utilisés pour produire la lumière d'excitation à 340 nm et 380 nm afin d'exciter le Fura-2. La fluorescence émise par le Fura-2 est collectée à 510 nm par un photomultiplicateur (PMT). La perfusion rapide d'agents pharmacologiques peut être réalisée à proximité immédiate de la cellule grâce au stylet chauffant.

a) Mesure des transitoires calciques

Les cardiomyocytes sont incubés dans une solution tampon HEPES de 0,75 mM de CaCl_2 , contenant 3 μM de la sonde Fura-2AM (Invitrogen) pendant 10 minutes à l'obscurité et à température ambiante. La charge à température ambiante permet d'éviter la

MATÉRIEL ET MÉTHODES

compartimentalisation de la sonde. Les cellules sont ensuite centrifugées 1 minute à 800 rpm, puis elles sont resuspendues dans le tampon HEPES avec 0,75 mM de CaCl_2 . Les cardiomyocytes sont incubés 15 min à 37°C afin de permettre la désestérification de la sonde (**Figure 58B**). Ensuite les cardiomyocytes chargés en Fura-2 sont placés dans la chambre expérimentale à l'obscurité afin d'éviter le photo-blanchiment de la sonde.

Les cellules sont illuminées par une lumière rouge produite par une lampe halogène 100 W et filtrée par un filtre passe haut de 610 nm.

La lumière d'excitation provient du monochromateur (CAIRN Research) couplé à une lampe Xenon de 150 W. Les cardiomyocytes sont soumis à une double excitation lumineuse à la longueur d'onde de 340 nm (spécifique de la sonde liée au Ca^{2+}) et de 380 nm (spécifique de la sonde libre en Ca^{2+}). La fluorescence émise par la sonde est séparée de la lumière d'excitation par un premier miroir dichroïque à 400 nm puis par un second miroir dichroïque à 600 nm. Les longueurs d'onde supérieures à 600 nm sont collectées par une caméra vidéo afin de visualiser les cellules sur l'ordinateur. Par contre, les longueurs d'onde inférieures à 600 nm passent au travers d'un filtre passe bande de 510 ± 20 nm permettant de sélectionner la lumière émise par la sonde Fura-2. La fluorescence émise par la sonde pour chaque longueur d'onde d'excitation est collectée par le tube photomultiplicateur (PMT) puis moyennée par le module de spectrophotométrie intégré au monochromateur. L'acquisition des signaux fluorescents se fait par le logiciel IonWizard (IonOptix) qui permet également de calculer le rapport de fluorescence $R_{\text{fluor}} = F_{340}/F_{380}$.

b) Mesure du raccourcissement des sarcomères

La mesure du raccourcissement des sarcomères est réalisée simultanément à la mesure du Ca^{2+} intracellulaire. Elle s'effectue grâce à une caméra CCD connectée au port latéral du microscope (**Figure 59**). Le système est préalablement calibré à l'aide d'un micromètre. La longueur des sarcomères est suivie en continu lors de la contraction de cardiomyocytes isolés grâce au logiciel IonWizard (IonOptix).

Le principe de cette mesure consiste à analyser l'espacement moyen entre les lignes Z de la cellule isolée sur l'image de la caméra par une transformée de Fourier appliquée sur une fenêtre spatiale définie par l'utilisateur. La fréquence spatiale dominante correspond à la longueur moyenne des sarcomères sur la fenêtre spatiale définie.

3. Analyses des données

a) Mesure du calcium intracellulaire par spectrofluorimétrie

L'analyse des transitoires calciques consiste à déterminer le niveau diastolique et systolique en Ca^{2+} afin d'évaluer l'amplitude ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{systolique}} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{diastolique}}$). De plus, la cinétique des transitoires est analysée avec notamment le temps pour arriver au pic systolique de Ca^{2+} ainsi que la constante de temps de décours du transitoire calcique (Tau Transitoire Ca^{2+}) (**Figure 60B**).

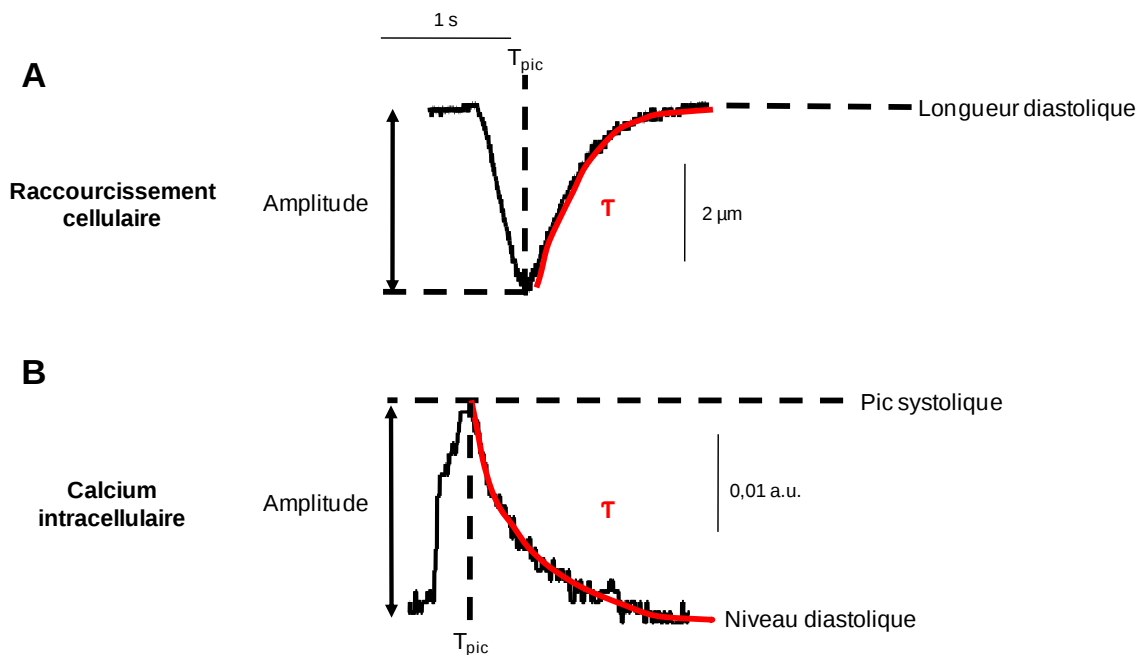


Figure 60. Analyse des paramètres contractiles et des transitoires calciques. Représentation de tracés montrant le raccourcissement d'un sarcomère (A) et le transitoire calcique associé (B) ainsi que les paramètres mesurés. Les tracés rouges reproduisent le fit exponentiel utilisé pour déterminer la constante de temps Tau (τ).

b) Mesure du raccourcissement des sarcomères

Le suivi de la longueur des sarcomères (LS) a permis d'analyser les longueurs diastoliques et systoliques, et ainsi de déterminer l'amplitude du raccourcissement des sarcomères ($\text{longueur}_{\text{diastolique}} - \text{longueur}_{\text{systolique}}$). Au niveau des cinétiques, le temps pour atteindre le pic systolique et la constante de temps de relaxation (Tau relaxation) sont également mesurés (**Figure 60A**).

VII/ Histologie

1. Préparation des tissus : marquage au trichrome de Masson

a) Fixation

Différents échantillons de myocarde d'une dimension de 1,5 x 1,5 cm sont prélevés en doublon sur chaque cœur d'animaux. Les prélèvements sont d'origines distinctes : VG antérieur, VD, RVOT. Ces échantillons sont ensuite fixés de façon chimique dans une solution tampon phosphate salin (PBS, *Phosphate-buffered saline*) 1X supplémentée de 4% de paraformaldéhyde (PFA) durant une semaine à 4°C sous agitation.

Après la fixation du tissu, les échantillons sont rincés plusieurs fois dans du PBS 1X.

b) Déshydratation-imprégnation

La déshydratation et l'imprégnation du tissu sont effectuées au moyen de l'automate Leica® TP 1020 suivant le protocole :

- 1 bain éthanol (ETOH) 70 % (5 minutes)
- 3 bains ETOH 95% (1 heure/bain)
- 3 bains ETOH 100% (1h30 pour les 2 premiers bains et 1h30 pour le dernier)
- 3 bains toluène (1 heure/bain)
- 2 bains paraffine (1 heure/bain)

La déshydratation va permettre d'éliminer l'eau tissulaire au moyen de bains d'ETOH successifs et le toluène favorise l'imprégnation de la paraffine dans le tissu.

c) Inclusion-coupe

Chaque échantillon est positionné dans une cassette selon une orientation déterminée : un échantillon dans le sens (1) longitudinal et son doublon dans le sens (2) transversal afin d'obtenir les fibres cardiaques dans le petit et le grand axe (**Figure 61**).

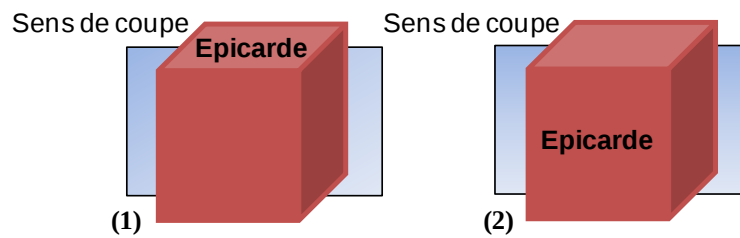


Figure 61. Représentation schématique de l'orientation des blocs de tissu lors de l'inclusion. Les blocs de tissu sont inclus dans le sens longitudinal (1) et dans le sens transversal (2).

Par la suite, les cassettes sont remplies de paraffine fondue sur une plaque à 4°C durant une heure afin que les blocs constitués se durcissent. Les échantillons sont ensuite conservés à -20°C.

Des coupes de 8 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome Leica® RM 2255 à partir des blocs de tissu. Les coupes sont placées dans un bain marie à 37°C et délicatement étalées sur lames.

d) Coloration

Après séchage des lames sur plaque chauffante pendant au moins deux heures, les lames sont colorées au Trichrome de Masson et à l'Hémalun. Le Trichrome de Masson colore les fibres de collagène en vert/bleu, l'Hémalun colore les noyaux en violet et la Fuchsine Ponceau colore les myocytes en rouge.

Cette coloration est effectuée grâce au Teinturier HMS 70 selon le protocole suivant (**Tableau 4**).

	Bains	Temps
Déparaffinage	Toluène	5 min
	Toluène	5 min
	Alcool 100%	5 min
Hydratation	Alcool 95%	4 min
	Alcool 80%	5 min
	Eau du robinet	4 min
	Hémalun	5 min
	Eau milliQ	5 min
Coloration	Fuch sine Ponceau 1%	1 min
	Acide phosphomolybdique 3%	1 min
	Eau acétifiée 1%	1 min
	Vert lumière 1%	2 min
	Eau acétifiée 1%	1 min
	ETOH 95%	3 min
Déshydratation	ETOH 95%	3 min
	ETOH 100%	3 min
	ETOH100%	3 min
	Toluène	3 min

Tableau 4. Tableau synthétisant le protocole utilisé pour la procédure de coloration au teinturier HMS70.

L'observation des coupes transversales et longitudinales des blocs de tissu est réalisée avec un microscope Nikon® eclipse 80i à l'objectif X10 et X40 couplé à une caméra CCD raccordée à un ordinateur équipé du logiciel NIS Elements3.2.

e) Quantification de la fibrose

La quantification de la fibrose est réalisée par le logiciel ImageJ®. Chaque image est soumise à un ajustement des seuils de reconnaissance des couleurs pour mettre en évidence et quantifier la couleur spécifique au collagène (vert lumière), laissant ainsi les zones de fibrose représentées en noir. Le signal positif (noir) est ensuite quantifié et exprimé en pourcentage de la superficie totale de la coupe.

2. Immunocytochimie

a) Principe

Cette technique permet de détecter et de localiser une protéine au niveau cellulaire ou tissulaire. Le marquage de la protéine d'intérêt peut être direct ou indirect.

L'immunomarquage direct nécessite un anticorps primaire couplé à un traceur (fluorophore ou enzyme). Le marquage indirect de la protéine d'intérêt nécessite l'utilisation d'anticorps primaires (AC I) puis d'anticorps secondaires (AC II) couplés à un fluorochrome ou une enzyme dirigés contre les AC I. Le marquage indirect peut être mis en évidence par fluorescence (utilisation de fluorochrome) ou par activité enzymatique (utilisation d'enzyme et de substrat) (**Figure 62**).

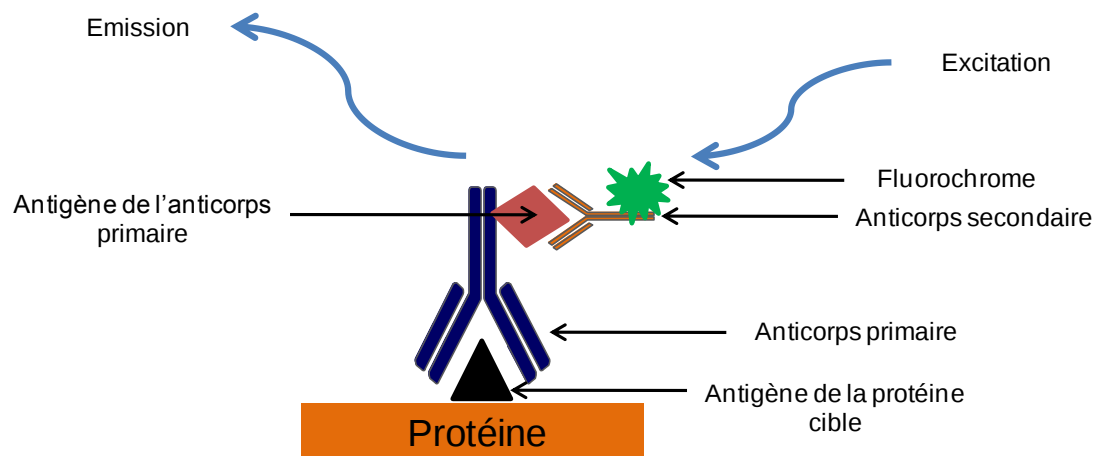


Figure 62. Principe de l'immunomarquage indirect. L'anticorps primaire (AC I) se fixe sur l'épitope de la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire (AC II) dirigé contre l'AC I est couplé à un fluorochrome. Après excitation à une longueur d'onde spécifique au fluorochrome, on observe une émission de fluorescence au niveau des protéines d'intérêt.

Il existe des procédés permettant d'amplifier le signal grâce à l'utilisation de complexe avidine-biotine. (**Figure 63**).

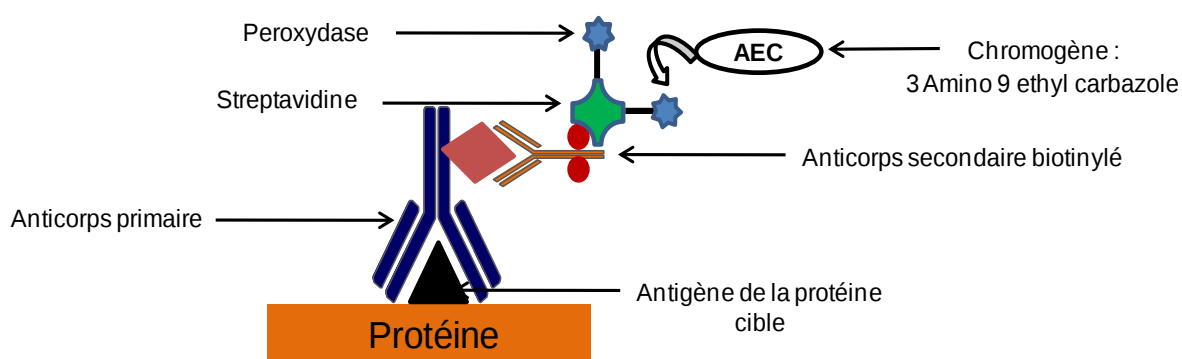


Figure 63. Principe de l'immunomarquage indirect amplifié par la streptavidine-biotine. L'AC I se fixe sur l'épitope de la protéine d'intérêt. L'AC II biotinylé se dirige contre l'AC I. La streptavidine couplée à la peroxydase permet d'amplifier le signal car elle peut lier quatre molécules de biotine. La peroxydase va dégrader l' H_2O_2 et libérer de l' O_2 qui va oxyder le substrat chromogène 3 Amino 9 ethyl carbazole (AEC).

Durant les travaux de cette thèse, le marquage indirect fut utilisé sur cellule et tissu puis le marquage indirect amplifié sur des coupes de tissu inclus en paraffine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les différents marquages sont visualisés au microscope Nikon® eclipse 80i et au microscope confocal (Olympus FV1000).

b) Immunofluorescence sur cardiomyocytes ventriculaires

Les cardiomyocytes ventriculaires isolés sont fixés avec du PFA 4% à température ambiante durant 30 minutes. Après rinçage des cellules au PBS 1X (3 fois 10 minutes), les cardiomyocytes sont perméabilisés avec du Triton 0,1% à température ambiante pendant 20 minutes. Les cellules sont à nouveau rincées au PBS 1X (3 fois 10 minutes) puis les sites de fixation non spécifiques sont bloqués grâce à une étape de saturation avec une solution de Glycine (111 mM) diluée dans du PBS et du sérum d'âne à 1% (Jackson ImmunoResearch). Ensuite les cardiomyocytes sont incubés avec les AC I dilués dans du PBS 1X toute la nuit en chambre humide à 4°C (**Tableau 5**).

Anticorps primaire	Lot et fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire	Lot et fournisseur	Dilution
Connexine 43 (souris)	lot 2309061 Millipore	1/200ème	Ane anti souris couplé au FITC	Lot 115855 Jackson Immuno Research	1/50ème
K _{v4.3} (lapin)	lot 2355319 Millipore	1/200ème	Ane anti lapin couplé Alexa 555	Lot 1134920 Invitrogen	1/50ème
N Cadherine (lapin)	lot GR1875961 Abcam	1/200ème	Chèvre anti lapin couplé au TRITC	Lot 114061 Jackson Immuno Research	1/1000ème

Tableau 5. Liste d'anticorps primaires et secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sur cardiomyocytes ventriculaires et sur coupes tissulaires de ventricule.

Le lendemain, après 4 lavages avec du PBS 1X, les cellules sont incubées une heure avec les AC II couplés à des fluorochromes dilués dans du PBS 1X et du sérum d'âne à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X puis les noyaux sont marqués au DAPI (Invitrogen) avec une dilution au 1/50000^{ème} pendant 5 minutes à température ambiante. Après plusieurs rinçages au PBS 1X, les cellules sont montées entre lame et lamelle après ajout de milieu de montage (Fluoroshield, Sigma). Les cellules sont observées au microscope confocal (Olympus FV1000) grâce à un objectif à immersion à huile X60 avec une acquisition de 40 µs/pixel. Le paramétrage des longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées est déterminé en fonction du spectre de chaque fluorophore (**Tableau 6**).

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'emission (nm)
DAPI	405	425-475
AlexaFluor 555	559	570-650

Tableau 6. Liste des fluorophores utilisés. Fluorophores couplés aux AC II avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission associées.

Pour les contrôles négatifs, les cardiomyocytes ont été incubés avec l'AC II sans incubation préalable avec l'AC I. Des contrôles positifs sont effectués sur des cellules HL-1 (lignée cellulaire atriale de souris) exprimant les connexines 40 et 43 (*Dias et al., 2014*).

c) Immunofluorescence sur coupe tissulaire de ventricules

Des prélèvements d'une dimension de 1,5 x 1,5 cm de VG, VD et RVOT sont effectués. La fixation de type physique consiste à congeler les échantillons dans de l'isopentane refroidi par l'azote (-80°C) pendant quelques secondes afin d'éviter des cryofractures. Par la suite, le tissu est inclus dans une colle liquide cryo-conservatrice, l'OCT (*optimal cutting temperature compound*), et est placé à -10°C afin de réaliser des coupes d'une épaisseur de 10 µm au cryostat Leica® CM 1850UV. Les tranches de tissu sont déposées sur des lames en évitant tous replis. Ensuite, les lames sont conservées à -80°C. Lors du protocole d'immunofluorescence, les coupes sont fixées au PFA 4% pendant 2 minutes puis rincées 2 fois 3 minutes dans du PBS 1X. La saturation des sites aspécifiques est réalisée avec du sérum d'âne (Jackson ImmunoResearch) durant une heure. Après 2 rinçages de 3 minutes, les coupes sont incubées avec les AC I (connexine 43 et N-cadherine) dilués dans du PBS-Triton 0,1% toute la nuit à 4°C en chambre humide (**Tableau 5**). Le lendemain, après 2 lavages de 3 minutes au PBS 1X, les coupes sont incubées avec les AC II pendant une heure à température ambiante. Les lames sont à nouveau rincées 2 fois au PBS 1X. Les coupes rincées sont montées avec une contre lamelle et du milieu de montage (Prolong). Les lames sont observées au microscope Nikon® eclipse 80i à l'objectif X40 et analysées avec le logiciel NIS Elements3.2.

Le paramétrage des longueurs d'onde d'excitation et d'émission utilisées est déterminé en fonction du spectre de chaque fluorophore (**Tableau 7**).

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)
Fluorescein FITC	465-495	515-555
Rhodamine (TRITC)	540-580	600-660

Tableau 7. Liste des fluorophores utilisés. Fluorophores couplés aux AC II avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission associées.

d) Immunoenzymologie sur coupe tissulaire de ventricules

Les coupes de tissu réalisées au microtome (cf. Section Préparation des tissus : marquage au trichrome de Masson) sont déparaffinées par un bain de toluène durant 7

MATÉRIEL ET MÉTHODES

minutes puis progressivement hydratées par différents bain d'ETOH (100%, 95%, 80%) de 5 minutes chacun. Les coupes sont ensuite rincées à l'eau du robinet pendant 4 minutes et au PBS 1X durant 10 minutes avant le protocole de coloration.

Le protocole de coloration (kit Equipements Histostain-® SP Invitrogen® Système de Détection LAB-SA) est basé sur une reconnaissance de la protéine d'intérêt par une réaction immunoenzymologique impliquant la reconnaissance de la protéine d'intérêt par un AC I et une révélation via l'activité enzymatique de la peroxydase de raifort (radis noir).

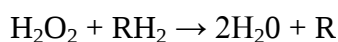
L'élimination préalable de l'activité de la peroxydase endogène est nécessaire. De ce fait, les coupes de tissu sont plongées dans une solution refroidissante de peroxyde d'hydrogène à 3% diluée dans du méthanol à -20°C pendant 10 minutes.

Ensuite, les différentes sections de tissu sont prétraitées avec une solution de citrate de sodium pH 6 (Dako®) diluée au 1/10^{ème} pendant 20 minutes à 100°C afin de démasquer les sites antigéniques. Après 3 rinçages au PBS 1X, les coupes de tissu sont incubées avec de l'avidine puis de la biotine (Dako®) à température ambiante afin de bloquer l'avidine et la biotine endogènes. Les coupes sont rincées abondamment au PBS 1X puis incubées avec une solution bloquante de sérum de chèvre à 10% durant 10 minutes afin de bloquer les sites non spécifiques. Les lames sont égouttées et incubées avec l'AC I connexine 43 (Millipore lot # 2194068) dilué au 1/250^{ème} dans un tampon Dako® S3033 en chambre humide à 4°C durant la nuit. Le lendemain après 3 lavages au PBS 1X, les coupes de tissu sont placées avec l'AC II biotinylé durant 10 minutes. Les lames sont à nouveau rincées 3 fois au PBS 1X puis incubées avec l'enzyme conjuguée, la streptavidine-peroxydase, pendant 10 minutes à température ambiante. Les sections sont ensuite lavées 3 fois dans du PBS 1X.

Durant les étapes suivantes les lames doivent être protégées de la lumière directe.

Le peroxyde d'hydrogène à 0,6% et le substrat de l'enzyme soit le chromogène AEC (3 Amino 9 ethyl-carbazole) de couleur rouge, instable à la lumière sont placés sur les coupes de tissu pendant 5-10 minutes et colorent les protéines d'intérêt en marron.

La réaction enzymatique s'effectue selon l'équation suivante :



Il s'agit d'une réaction d'oxydoréduction avec une oxydation d'un substrat réduit (RH₂) en un produit oxydé coloré (R) grâce au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

Les lames sont ensuite rincées à l'eau distillée et contre-colorées dans un bain d'hématoxyline durant une minute. Après un nouveau lavage à l'eau distillée afin d'éliminer l'excès d'hématoxyline, le montage des coupes s'effectue avec une lamelle et du ClearMount™. Les lames sont placées à sécher dans un incubateur à 60°C pendant 30 minutes. Les coupes de

tissu sont observées avec un microscope Nikon® eclipse 80i à l'objectif X40 et analysées avec le logiciel NIS Elements3.2.

3. Marquage des lipides par l'huile rouge

La détection des lipides est possible sur des coupes histologiques grâce à l'utilisation d'huile rouge appelée « Red oil » (ORO). L'ORO ($C_{26}H_{24}N_4O$) est un colorant diazole liposoluble avec une absorption maximale à 518 nm. Il peut marquer les lipides neutres tels que les TG et les esters de cholestérol constituant le cœur des gouttelettes lipidiques. L'ORO ne marque ni les lipides polaires (phospholipides) qui forment la mono couche autour du cœur des gouttelettes lipidiques et ni les lipides de la membrane plasmique des cellules (*Fowler and Greenspan, 1985*).

Des prélèvements d'une dimension de 1,5 x 1,5 cm provenant du VD et du RVOT sont effectués. La fixation de type physique consiste à congeler les échantillons dans de l'isopentane refroidi par l'azote (-80°C) pendant quelques secondes. La congélation chimique avec le PFA à 4% ainsi que les processus décrits dans la section : Immunoenzymologie sur coupe tissulaire de ventricules n'est pas réalisable. En effet, les solvants utilisés lors du protocole de déshydratation ainsi que le déparaffinage pourraient dissoudre les lipides.

Par la suite, le tissu est inclus dans de l'OCT et est placé à -10°C afin de réaliser des coupes d'une épaisseur de 12 µm au cryostat Leica® CM 1850UV. Les tranches de tissu sont déposées sur des lames en évitant tout repli. Ensuite les lames sont mises à sécher et sont conservées à -80°C. Pour réaliser la coloration des gouttelettes lipidiques, il est nécessaire de produire une solution mère d'ORO (Sigma Aldrich) de 15,3 mM diluée dans de l'alcool isopropyl 99%. A partir de la solution mère d'ORO est réalisée une solution fille d'emploi de 9,27 mM diluée dans de l'eau distillée. La solution fille est placée à 4°C durant 10 minutes afin que la solution s'épaississe. Par la suite, la solution est filtrée par un filtre de 45 µm pour éliminer les résidus de précipitation.

Les sections sont sorties du congélateur à -80°C et laissées à température ambiante durant 10 min. La solution fille ORO est ajoutée afin de recouvrir chaque section de tissu durant 5 minutes (*Mehlem et al., 2013*). Les sections sont ensuite rincées dans plusieurs bains d'eau pendant 30 min. Puis elles sont contre-colorées par une solution d'hématoxyline durant une minute puis rincées à l'eau. Les coupes sont montées avec une lamelle et du milieu de montage ClearMount™. Les coupes de tissu colorées à l'ORO sont observées avec un

microscope Nikon® eclipse 80i aux objectifs X10, X40 et X60 puis analysées avec le logiciel NIS Elements3.2.

4. Technique de Microscopie

a) Principe de la microscopie à épifluorescence

La microscopie à fluorescence permet de visualiser la fluorescence émise par des fluorochromes introduits dans l'échantillon. La technique de microscopie à fluorescence est la même que la microscopie optique à fond clair sauf que la lumière utilisée n'est pas blanche mais possède une gamme définie de longueurs d'onde.

Différents éléments sont nécessaires pour l'obtention d'un signal fluorescent en microscopie par épifluorescence comme une lampe halogène pour étudier des échantillons en transmission de même qu'en microscopie à fond clair. Une lampe à arc (souvent une lampe à vapeur de Mercure ou Xenon) qui possède des raies caractéristiques dans son spectre, va permettre d'exciter les fluorochromes utilisés pour marquer les échantillons biologiques. Le trajet optique comprend différentes lentilles, prismes, cubes à fluorescence (filtre d'excitation, miroir dichroïque, filtre d'émission). Le filtre d'excitation, le miroir dichroïque et le filtre d'émission sont assemblés dans un seul bloc et peuvent être changés et choisis en fonction du fluorochrome utilisé.

Le rayonnement émis par la lampe de Mercure est filtré en longueur d'onde grâce à un filtre d'excitation qui conserve une bande étroite du spectre lumineux. Ce faisceau est réfléchi vers l'échantillon par un miroir dichroïque. Le rayonnement fluorescent émis par l'échantillon est sélectionné ensuite par un filtre d'émission (**Figure 64**).

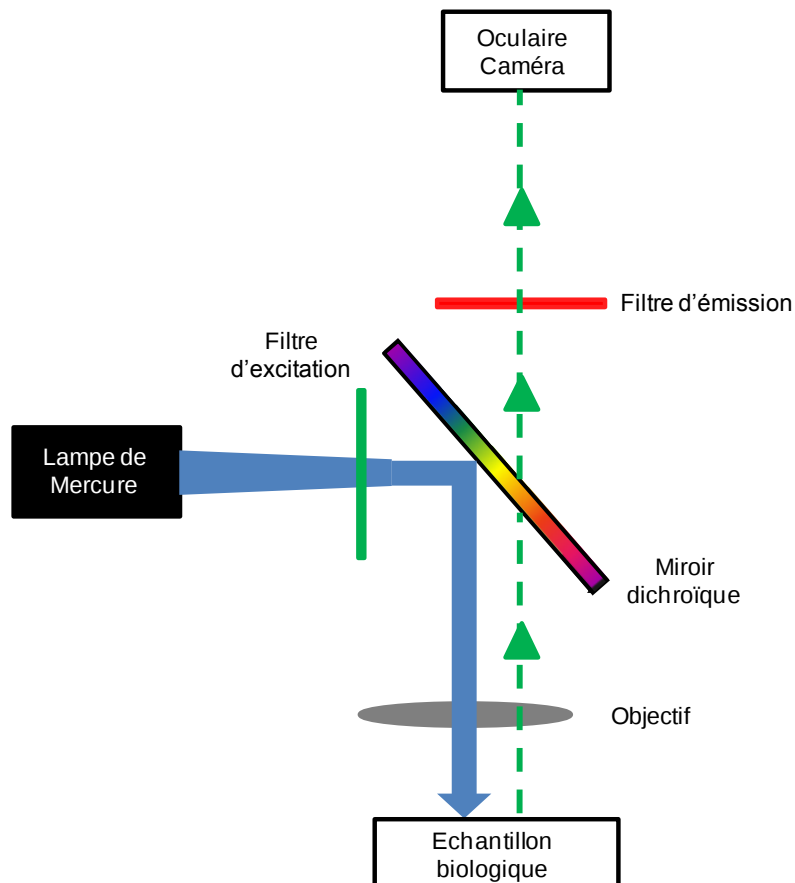


Figure 64. Représentation schématique du microscope à fluorescence. Les rayonnements lumineux émis par la lampe de Mercure traversent un filtre d'excitation afin de permettre la sélection des longueurs d'onde qui vont exciter l'échantillon biologique. Le faisceau lumineux va être réfléchi par le miroir dichroïque puis va exciter le fluorochrome contenu dans l'échantillon. La fluorescence émise par l'échantillon est filtrée grâce à un filtre d'émission qui va permettre d'éliminer lors de l'observation, certaines longueurs d'onde émises par le fluorochrome en réponse à l'excitation.

b) Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale décrite pour la première fois en 1957 par Minsky permet de visualiser des objets dans un seul plan focal d'une épaisseur d'environ 400 nm, sans être parasité par la fluorescence des plans adjacents.

Plusieurs éléments sont nécessaires à l'obtention de signaux fluorescents :

- une source lumineuse pour l'excitation (laser)
- des filtres pour séparer les photons d'émission des photons d'excitation
- un détecteur : photomultiplicateur (PMT)

Sur le même principe que la microscopie à fluorescence traditionnelle, l'échantillon doit être marqué par un fluorochrome. Ce dernier est alors excité par un laser qui va balayer l'échantillon selon les directions X, Y, Z.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Il y a émission de rayons fluorescents résultant de l'excitation, qui vont être captés par le PMT. Le signal est numérisé afin de permettre la reconstruction de l'image point par point à l'écran.

En microscopie à fluorescence traditionnelle, on observe une perte de la résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal.

En microscopie confocale, la présence d'un « pinhole » (petit trou) placé devant le détecteur permet d'éliminer le signal fluorescent provenant des plans autres que le plan focal (**Figure 65**).

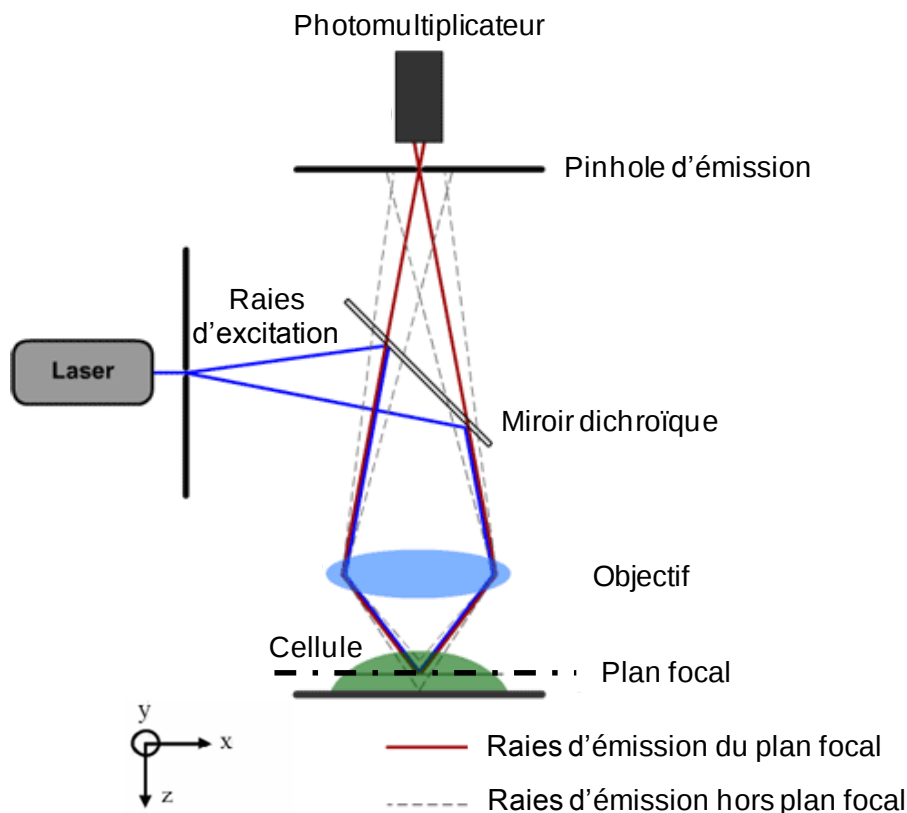


Figure 65. Représentation schématique du microscope confocal. Les rayonnements lumineux émis par le laser sont réfléchis par le miroir dichroïque sur l'échantillon cellulaire afin d'exciter la sonde fluorescente contenue dans celui-ci. La fluorescence émise par l'échantillon est filtrée grâce à un pinhole. Le pinhole permet d'éliminer la fluorescence émise en dehors du plan focal. Seule la fluorescence issue du plan focal sera détectée par le PMT. Adapté du site internet http://www.univie.ac.at/universitat_wien.

5. Marquage des tubules T

Afin de visualiser l'organisation des tubules T sur des cardiomyocytes fraîchement dissociés, la sonde di-8-ANEPPS est utilisée. Il s'agit d'une sonde fluorescente à haute affinité membranaire (cf. Section Sondes sensibles au potentiel membranaire) (Louch et al., 2004).

Les cardiomyocytes fraîchement dissociés sont mis à incuber pendant 5 min avec le di-8-ANEPPS (5 μ M) (Sigma Aldrich) dissout dans le diméthyl sufoxyde (DMSO).

Par la suite, les cellules sont centrifugées durant 1 min à 800 rpm puis resuspendues dans la solution tampon HEPES contenant 0,75 mM de CaCl₂ et conservées à l'obscurité.

Les cardiomyocytes sont placés dans une chambre expérimentale montée sur un microscope confocal Olympus FV1000. L'observation des cellules est réalisée au moyen d'un objectif X60 à immersion à huile.

Le logiciel Fluoview (Olympus) permet de contrôler les paramètres d'excitation et d'acquisition. Ainsi, l'excitation de la sonde est réalisée par un laser à 488 nm et la fluorescence émise est collectée à 600 ± 20 nm. L'acquisition des images a été effectuée à une résolution de 1600 x 1600 pixels à une vitesse de 40 μ s/pixel.

A partir des images obtenues au microscope confocal (**Figure 66A**), plusieurs paramètres tels que la distance entre les tubules T, l'index de régularité des tubules T ainsi que la longueur des sarcomères sont déterminés. A l'aide du logiciel Image J[®], un profil d'intensité sur toute la longueur des cardiomyocytes est obtenu (**Figure 66B**). Une transformée de Fourier rapide (FFT) est appliquée en utilisant le logiciel Origin[®]. En d'autres mots, les striations régulières observées sur les images dans la dimension spatiale se définissent par un pic de fréquence (fréquence spatiale dominante) grâce à la FFT (**Figure 66C**). L'inverse de la fréquence spatiale dominante permet d'obtenir la distance entre les tubules T.

La même méthode est appliquée pour déterminer la longueur des sarcomères, ainsi que l'indice de régularité du réseau de tubule T (puissance). Plus la valeur du pic est importante, plus le réseau des tubules T est régulier.

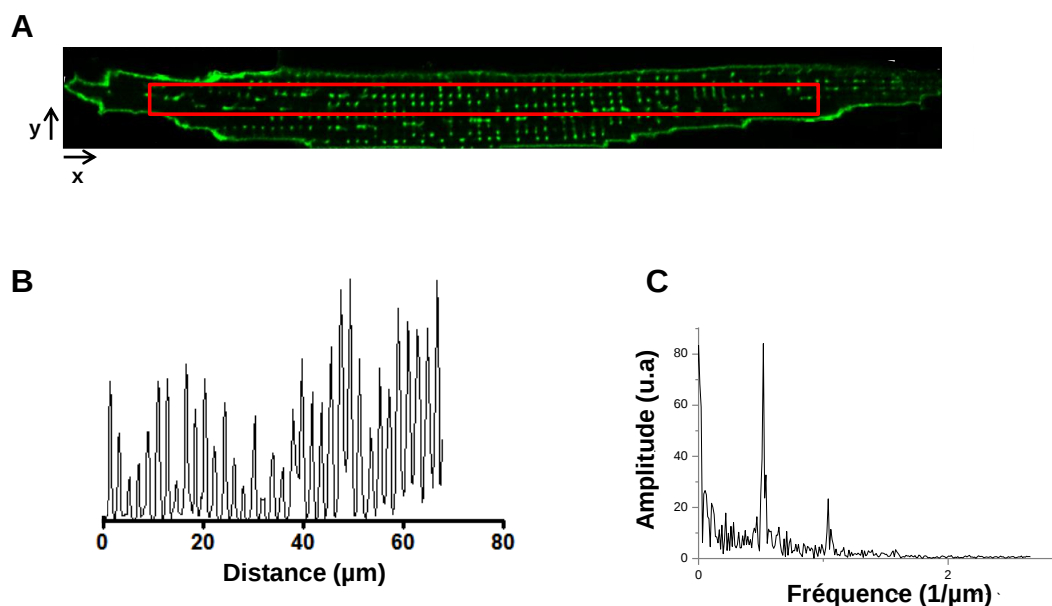


Figure 66. Analyse de la densité du réseau de tubules T. Image obtenue en microscopie confocale d'un cardiomyocyte ventriculaire dont le réseau de tubules T est marqué au di-8-ANEPPS (A). Un profil d'intensité de fluorescence est réalisé à partir de la zone sélectionnée (en rouge) sur l'image. Chaque pic correspond à un tubule T (B). Une transformation du signal fluorescent est effectuée dans l'espace des fréquences à partir de la FFT (C). La fréquence spatiale dominante ainsi que l'indice de régularité du réseau de tubule T sont déterminés. L'espace entre les tubules T correspond à l'inverse de la fréquence.

VIII/ Biologie moléculaire

1. Extraction des protéines

Des échantillons de VG, VD et RVOT (compris entre 10 et 30 mg) sont freeze clampés dans de l'azote liquide. Ces échantillons sont broyés mécaniquement à 4°C à l'aide d'un broyeur électrique (Ultraturax) dans un tampon de lyse contenant 500 µL de tampon RIPA, 5 µL d'inhibiteurs de protéases (cocktail P8340 SIGMA) et de phosphatases 100X (cocktail P0044 Sigma). L'homogénat est vortexé durant quelques minutes puis soumis à une étape de sonication d'une heure avant d'être centrifugé à 12000 g pendant 15 minutes à 4°C. Les protéines récupérées dans le surnageant sont ensuite dosées par la méthode BCA (dosage à l'acide bicinchoninic) en comparaison avec une gamme étalon.

Ce dosage colorimétrique est basé sur la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^{+} par les protéines en milieu alcalin. Les ions Cu^{+} réagissent avec le BCA pour former un complexe de couleur violet stable et mesurable à 570 nm. La quantité de Cu^{2+} réduite est proportionnelle à la concentration de protéines présente dans le tissu (Figure 67).

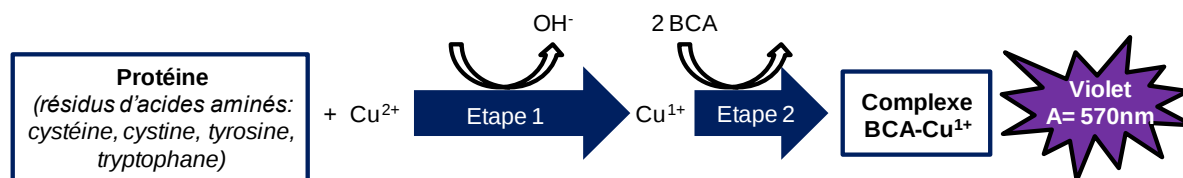


Figure 67. Représentation schématique de la méthode de dosage BCA colorimétrique. L'étape 1 représente la réduction des ions Cu^{2+} en présence de protéines contenant les résidus d'acides aminés tels que la cystéine, la cystine, la tyrosine et le tryptophane. L'étape 2 correspond à la formation d'un complexe violet BCA-Cu^{1+} qui absorbe à 570 nm après l'ajout du chromogène l'acide bicinchonin (BCA).

Par la suite, afin de préparer les western-blot, les protéines sont diluées dans un tampon de charge dénaturant 2X (BioRad®) avec 20 μL de DTT (dithiothréitol) puis dénaturées à 95°C pendant 5 minutes.

2. Western-Blot

Le western-blot permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. La plupart des protéines étudiées dans le cadre de cette thèse ont un faible poids moléculaire essentiellement compris entre 43 et 65 kDa.

Ensuite 50 μg de protéines sont déposées sur un gel d'électrophorèse (TGX Stain Free™ FastCast™ Acrylamide kit 12%). Ces gels ont la particularité de contenir des composants trihalogénés qui peuvent former des liaisons covalentes avec les résidus tryptophane des protéines présentes dans les échantillons biologiques lors d'une exposition aux ultraviolets (UVs), et induisent ainsi une émission de fluorescence.

Le gel d'électrophorèse s'effectue en deux parties afin de pallier aux problèmes liés aux faibles quantités de protéines déposées dans les puits. On effectue donc une étape de concentration jusqu'à l'obtention de zones protéiques très fines dans le gel de concentration (4% d'acrylamide) puis une étape de migration dans le gel de séparation (12% d'acrylamide). La migration des protéines s'effectue par électrophorèse durant une heure à 200 V dans un tampon de migration contenant 25 mM Tris, 192 mM de glycine et 0,01% Sodium-Dodécyl-Sulfate. Une fois la migration des protéines terminée, le gel est récupéré dans son tampon de migration et est activé aux UVs via le ChemiDoc™ MP System ou G-Box Syngene afin de mettre en évidence les smears de protéines.

Par la suite, le transfert des protéines est réalisé en mode semi-sec (kit Turbo TransBlot, BioRad®) selon le programme (1,3 A ; 25 V ; 7 minutes). Pour le transfert, les éléments suivants sont déposés dans l'ordre dans une cassette : un papier Whatman, une membrane PVDF (Polyvinylidène Difluoride) le gel et un deuxième papier Whatman. Chaque élément

MATÉRIEL ET MÉTHODES

est préalablement imbibé dans du tampon de transfert. La membrane est ensuite saturée pendant 45 minutes dans du TBS-Tween 0,05% contenant 3% de lait écrémé Régilait® à température ambiante.

Après cette étape de saturation, la membrane est incubée avec les AC I dilués dans du TBS-Tween 0,05%-lait 3% durant toute la nuit à 4°C sous agitation en chambre froide (**Tableau 8**).

Anticorps primaire	Lot et fournisseur	Dilution	Anticorps secondaire	Lot et fournisseur	Dilution
Connexine 43 (lapin)	Lot SAB4300504 SIGMA	1/500 ^{ème}	Chèvre anti lapin couplé à l'HRP	BioRad	1/2000 ^{ème}
K _{V7.1} (lapin)	Lot APC022AN0925 Alomone	1/400 ^{ème}	Chèvre anti lapin couplé à l'HRP	BioRad	1/2000 ^{ème}
K _{V4.3} (lapin)	Lot 2355319 Millipore	1/200 ^{ème}	Chèvre anti lapin couplé à l'HRP	BioRad	1/2000 ^{ème}

Tableau 8. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le Western-Blot.

Le lendemain après 2 lavages de 10 minutes dans du TBS-Tween 0,05%, la membrane est incubée avec les AC II appropriés couplés à l'HRP pendant 2 heures à température ambiante. Après 2 lavages de 10 minutes, la membrane est placée dans le ChemiDoc™ MP System ou G-Box Syngene afin de quantifier la totalité des protéines hybridées avant la révélation. Cette étape permet de quantifier la quantité de protéine déposée, généralement contrôlée par la mesure de la quantité de protéine de référence (β -actine, GADPH...). Ensuite la membrane est révélée par la méthode ECL à l'aide du kit Thermo Scientific contenant un substrat chimiluminescent de la peroxydase. Les protéines d'intérêt sont détectées par chimiluminescence grâce au ChemiDoc™ MP System ou G-Box Syngene. L'analyse des résultats est effectuée à partir du logiciel Image J®. La quantification de l'intensité de chaque bande spécifique et l'intensité totale de chaque ligne est réalisée afin de déterminer les protéines totales et ainsi normaliser les valeurs d'intensité des bandes spécifiques.

IX/ Tests statistiques

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type. Chaque expérience est répétée plusieurs fois avec n correspondant au nombre de cellules testées pour chaque groupe cellulaire et N au nombre de cœurs de cochons.

L'outil mathématique utilisé afin de déterminer la significativité statistique des différences entre nos échantillons est le test de Student. Il permet de comparer deux groupes lorsque les variances sont égales. Dans le cas où l'égalité des variances entre les deux groupes est différente, un test non paramétrique : le test de Mann-Whitney est employé.

Lors de la comparaison de paramètres issus de deux régions d'une même préparation ventriculaire, des tests appariés sont effectués.

Pour l'analyse des résultats obtenus en cellulaire, une analyse de variance (ANOVA) à un facteur est réalisée.

La corrélation de différents paramètres est testée par régression linéaire.

Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque la probabilité d'erreur P est inférieure à 0,05 (*) ; à 0,01 (**) et 0,001 (***).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette partie « Résultats et discussion » de ce manuscrit expose les données expérimentales obtenues durant cette thèse et s'articule autour de deux études.

La première étude traitant de la caractérisation électrophysiologique et structurelle de l'infundibulum pulmonaire n'a pas été encore soumise pour publication et sera donc présentée sous forme de résultats préliminaires.

Par la suite, les travaux menés sur le remodelage électrophysiologique et structurel du VD et VG dans un modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée seront présentés sous forme d'articles scientifiques soumis :

- Pro-Arrhythmic remodeling of the right ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot
- Arrhythmogenic remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot

Ils seront complétés de résultats supplémentaires n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication.

En parallèle de cette deuxième étude, nous avons pu contribuer à une caractérisation sur le plan génétique du modèle porcin utilisé dont les résultats furent publiés dans le journal scientifique PlosOne sous le titre de :

Identification of region-specific myocardial gene expression patterns in a chronic swine model of repaired Tetralogy of Fallot (cf. Annexe 1).

Première étude : Hétérogénéité des propriétés de conduction et de repolarisation au sein du ventricule droit de cochon

I/ Contexte et objectifs

L'origine embryologique distincte entre le VD et le VG confère une identité propre à chaque ventricule sur le plan électrophysiologique (*Boukens et al., 2009*). Ainsi, les variations concernant le profil d'expression de gènes codant pour certains canaux ioniques ou d'autres protéines comme les connexines, sont responsables au sein des ventricules de l'hétérogénéité des propriétés électrophysiologiques (*Watanabe et al., 1983*). Par exemple, l'activation ventriculaire se termine dans le VD et celui-ci possède également des APDs

courts par rapport au VG (*Arteyeva et al., 2015*). Il existe aussi des disparités structurelles entre le VD et le VG comme une rotation différente des fibres myocardiques (*Haddad et al., 2008b*).

De plus, il y a au sein même de la cavité ventriculaire droite, des différences sur le plan anatomique et embryologique entre l'infundibulum pulmonaire et le reste du VD. Ainsi, le RVOT se met en place tardivement lors du développement embryonnaire puisqu'il apparaît lors de la septation du cono-truncus vers le 45^{ème} jour de vie intra-utérine. Il se présente sous une forme conique et il s'étend de la crista supraventricularis à la valvule pulmonaire. Sa maturation est beaucoup plus lente que celle du VD. En effet, durant le stade embryonnaire, le RVOT possède de faibles propriétés contractiles et des propriétés de conductions lentes liées à l'absence de la Cx43 (*Moorman and Christoffels, 2003*).

A l'âge adulte, l'infundibulum pulmonaire exprime en faible proportion les gènes *Gja1* et *SCN5A* codant respectivement pour la protéine Cx43 et le canal Na_v1.5, garantissant une VC lente au sein du RVOT par rapport à la paroi libre du VD (*Boukens et al., 2013*). L'expression hétérogène du canal Na_v1.5 et de la Cx43 conduit à des différences régionales des VC au sein de la cavité ventriculaire droite, rendant le VD plus vulnérable aux troubles de conduction et aux arythmies. En effet, la majorité des tachycardies idiopathiques proviennent de la région RVOT, et ce dernier est impliqué dans l'arythmogénicité de nombreuses pathologies telles que le syndrome de Brugada, la DAVD, et l'ICD.

Nous avons donc souhaité caractériser les propriétés électrophysiologiques et structurelles du VD et plus particulièrement de l'infundibulum pulmonaire ou RVOT sur l'animal sain.

II/ Résultats

1. Propriétés de repolarisation

a) Caractérisation *in vivo*

Les potentiels d'action monophasiques (MAPs) ont été enregistrés *in vivo* sur la surface sub-épicaudique de la paroi libre du VD et du RVOT chez 5 cœurs de cochons sains en rythme sinusal ($2,0 \pm 0,8$ Hz) (**Figure 68A**). Les MAPDs mesurés à 20% de repolarisation (MAPD₂₀) sont de $76,13 \pm 11,73$ ms au niveau du RVOT et de $90,17 \pm 11,42$ ms au sein de la paroi libre du VD. Les valeurs obtenues pour les MAPDs mesurés à 80% de repolarisation (MAPD₈₀) sont de $247,8 \pm 19,74$ ms au niveau du RVOT et de $263,45 \pm 18,53$ ms pour la paroi libre du VD. Les MAPD₂₀ et les MAPD₈₀ sont significativement plus courts, respectivement de 16% et 6% au niveau du RVOT par rapport à la paroi libre du VD (**Figure 68B**).

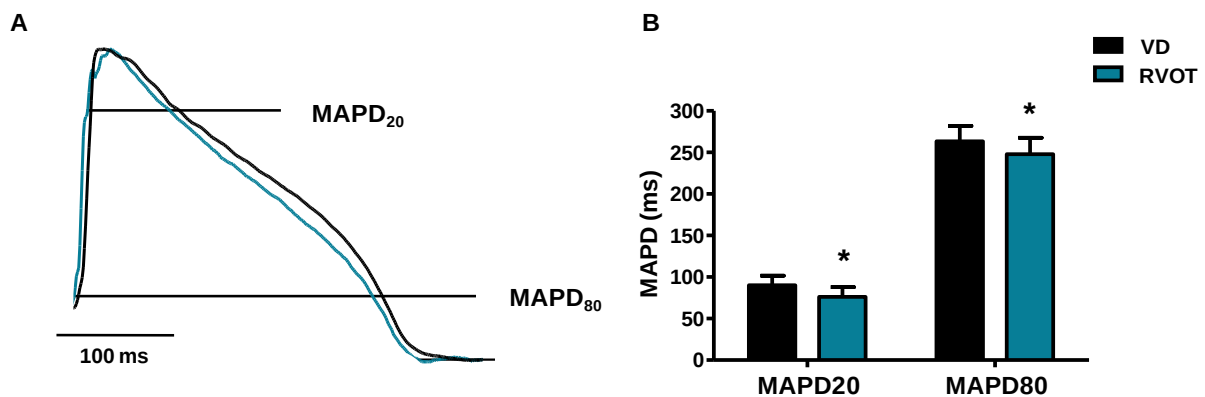


Figure 68. Potentiels d'action monophasiques sur cœur de cochon sain en rythme sinusal. Représentation de potentiels d'action monophasiques (MAPs) enregistrés *in vivo* au niveau du sub-épicaudique de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) (**A**). Les MAPs sont mesurées à 20% (MAPD₂₀) et 80% (MAPD₈₀) du temps de la repolarisation à partir de l'amplitude maximale pour le VD et le RVOT (**B**). MAPD₂₀ et MAPD₈₀ sont significativement plus courts au niveau du RVOT par rapport à la paroi libre du VD. * $P < 0,05$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 5$ cœurs de cochons sains.

b) Caractérisation *ex vivo* sur cœur entier

Des PAs optiques ont été enregistrés sur la surface sub-épicaudique au niveau de la paroi libre du VD et du RVOT sur 6 cœurs de cochons sains isolés et perfusés en rythme sinusal. Les APDs mesurés à 80% (APD₈₀) de repolarisation sont significativement plus

courts au niveau du RVOT ($307,32 \pm 44,23$ ms) en comparaison à la paroi libre du VD ($343,1 \pm 23,42$ ms) (**Figure 69**).

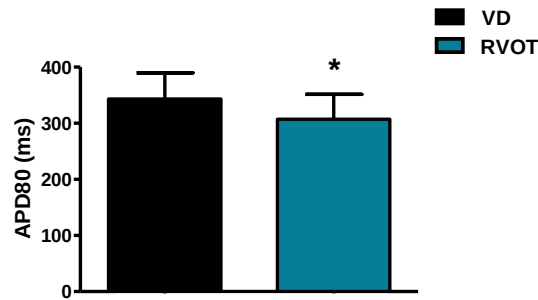


Figure 69. APD₈₀ mesuré sur cœur entier de cochon en rythme sinusal. Les APD₈₀ sont mesurés en cartographie optique au niveau de la face sub-épicaudique de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) en rythme sinusal sur cœur entier isolé et perfusé en Langendorff. Les APD₈₀ sont significativement plus courts au niveau du RVOT par rapport au VD. * $P < 0,05$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 6$ cœurs de cochons sains.

c) Caractérisation ex vivo sur préparation ventriculaire RVOT-VD

Des PAs optiques ont été enregistrés sur la surface sub-épicaudique (EPI) et sub-endocardique (ENDO) au niveau de la paroi libre du VD et du RVOT sur 6 préparations ventriculaires RVOT-VD isolées et perfusées (**Figure 70A**). Les préparations ont été stimulées à 1 Hz au niveau de deux sites du myocarde : la face ENDO du RVOT (**Figure 70B**) et la face ENDO de la paroi libre du VD (**Figure 70C**).

Au niveau du premier site de stimulation (face ENDO du RVOT), aucune différence d'APDs n'est observée entre la paroi libre du VD et du RVOT pour les faces EPI et ENDO (**Figure 70B**).

Concernant le deuxième site de stimulation (ENDO de la paroi libre du VD), les APDs mesurés à 20% de repolarisation (APD₂₀) sont de $140,74 \pm 32,98$ ms pour le RVOT et de $195,94 \pm 34,50$ ms pour la paroi libre du VD. Les APDs mesurés à 80% de repolarisation (APD₈₀) sont de $268,59 \pm 15,15$ ms au niveau du RVOT et de $306,64 \pm 32,93$ ms au sein de la paroi libre du VD. Les APD₂₀ et APD₈₀ sont significativement plus courts, respectivement de 28% et de 12% au niveau de l'EPI du RVOT par rapport à l'EPI de la paroi libre du VD (**Figure 70C**). Toutefois, les APD₂₀ et les APD₈₀ enregistrés au sein de la face ENDO de la paroi libre du VD et du RVOT sont similaires pour le deuxième site de stimulation (**Figure 70C**).

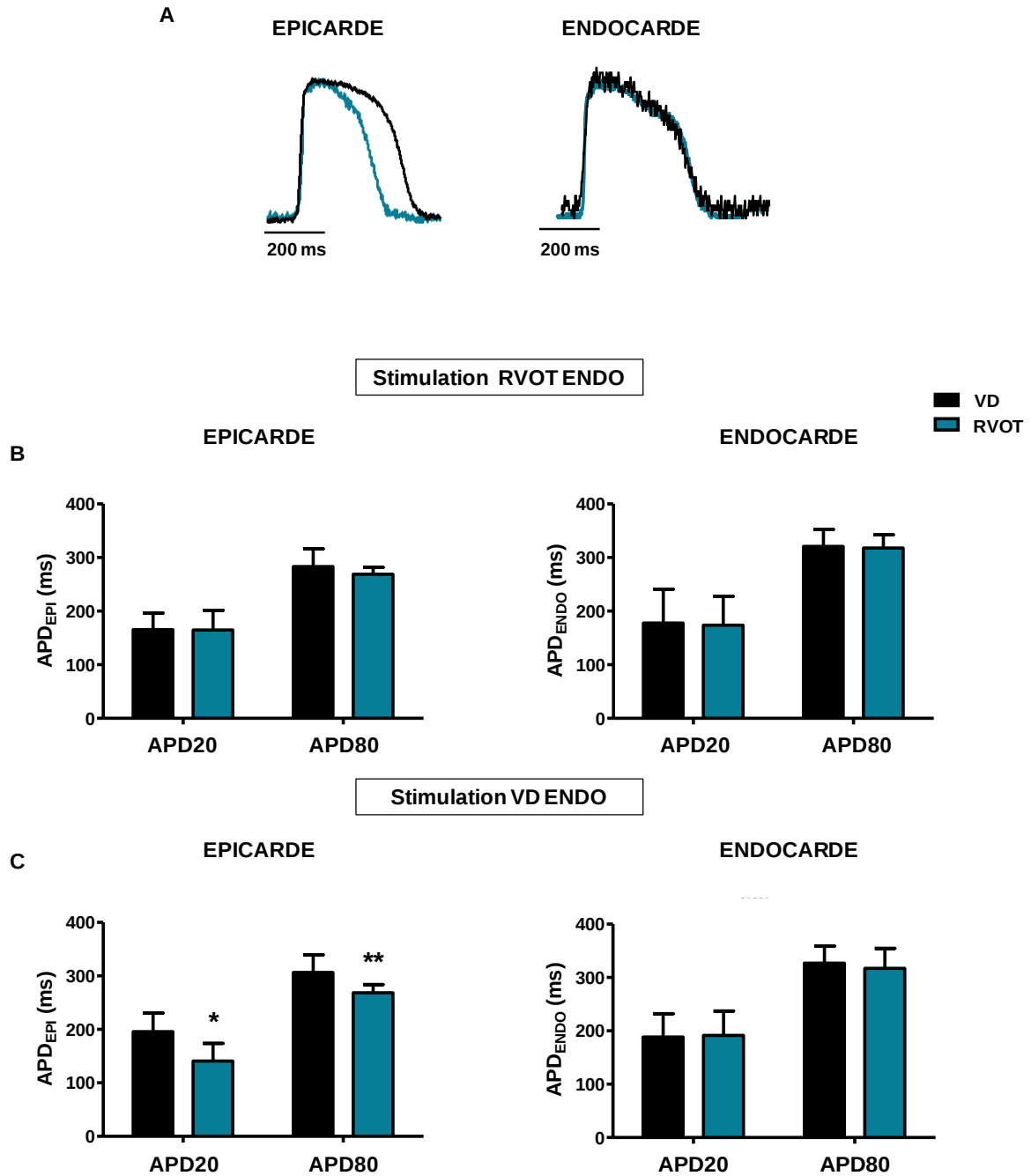


Figure 70. APD₂₀ et APD₈₀ mesurés sur préparation ventriculaire RVOT-VD. Représentation de PAs optiques enregistrés au niveau de l'EPI et de l'ENDO de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) (A). Les ventricules sont stimulés à 1 Hz au niveau de la face ENDO du RVOT (B) et de la paroi libre du VD (C). Les APDs sont mesurés à 20% (APD₂₀) et 80% (APD₈₀) de repolarisation au niveau des surfaces EPI et ENDO de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu). Notons la présence d'APD₂₀ et d'APD₈₀ significativement plus courts au niveau de la face EPI du RVOT (C) après une stimulation électrique de la surface ENDO de la paroi libre du VD. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 (paroi libre du VD versus RVOT), N = 6 cœurs de cochons sains.

Stimulation du RVOT sub-endocardique :

Les courbes de restitution des APD_{20} et des APD_{80} (**Figure 71**) permettent d'apprécier l'adaptation des APDs en fonction de l'augmentation de la fréquence cardiaque.

Après une stimulation de la face ENDO du RVOT sur une gamme de fréquence de 1 (1000 ms) à 5 Hz (200 ms) avec des incréments de 0,5 Hz, nous observons des similitudes entre les APDs enregistrés au niveau de la surface EPI avec la paroi libre du VD et du RVOT (**Figure 71A et C**). Seulement une différence significative des APD_{20} (3 Hz) est observée avec un APD_{20} plus court au sein du RVOT ($101,73 \pm 24,35$ ms) en comparaison avec la paroi libre du VD ($118,24 \pm 17,46$ ms) sub-épicaire (**Figure 71A**). Pour les mêmes enregistrements, les APD_{80} mesurés à 1,5 et 2 Hz sont respectivement plus courts au sein de l'EPI du RVOT de 12% et 9% par rapport à la paroi libre du VD (**Figure 71C**). Malgré la présence de quelques différences isolées des APDs au niveau de la surface EPI, les pentes des courbes de restitution sont similaires (**Figure 71A et C**).

Concernant les APDs enregistrés au niveau de la surface ENDO (**Figure 71B et D**), nous observons seulement une différence significative des APD_{20} (3,5 Hz) entre la paroi libre du VD ($78,17 \pm 25,78$ ms) et le RVOT sub-endocardique ($127,42 \pm 13,71$ ms). Les APD_{20} sont plus longs au sein du RVOT par rapport à la paroi libre du VD. Aucune différence significative au sein des pentes des courbes de restitution des APD_{20} (**Figure 71B**) et des APD_{80} (**Figure 71D**) ne sont observées.

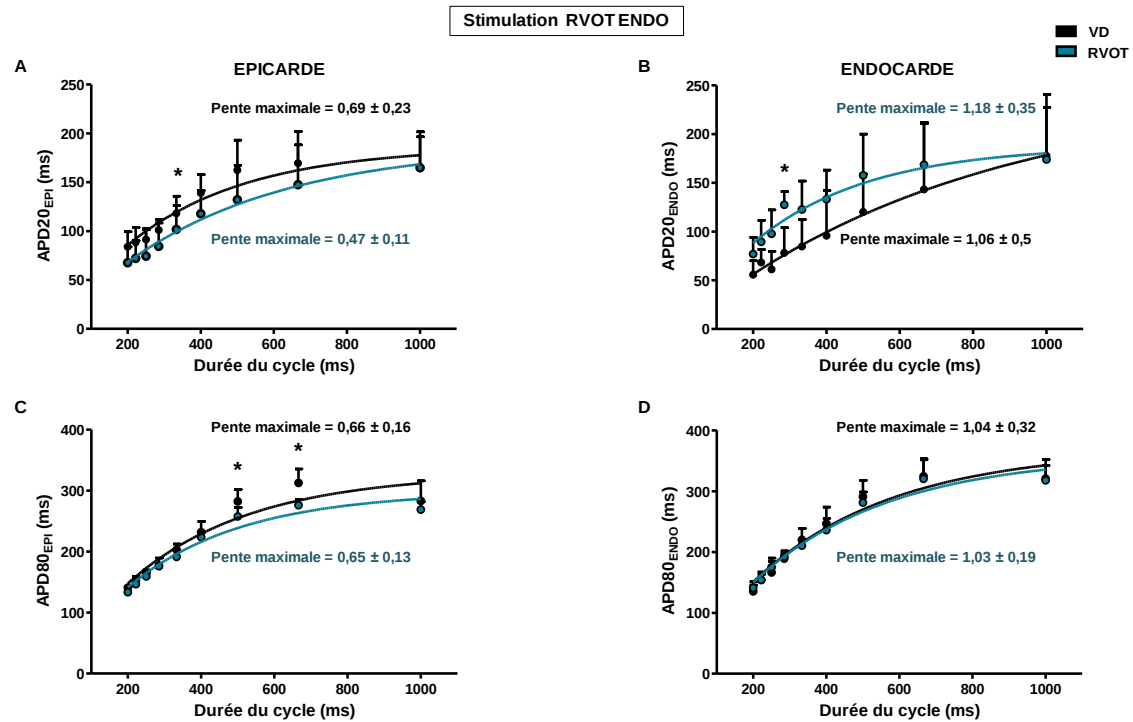


Figure 71. Stimulation du RVOT ENDO : Courbes de restitution dynamique sub-épiscopique et sub-endocardique des APD₂₀ et des APD₈₀ de la paroi libre du VD et du RVOT. Représentation des courbes de restitution des APD₂₀ EPI (A) et ENDO (B) ainsi que des APD₈₀ EPI (C) et ENDO (D) après une série de stimulation au niveau de la paroi ENDO du RVOT à différentes fréquences, allant de 1 à 5 Hz (période correspondant de 1000 ms à 200 ms). Les pentes maximales de restitution APD₂₀ et APD₈₀ pour chaque courbe sont calculées pour les faces EPI et ENDO. Les courbes de restitution sub-épiscopique et sub-endocardique de la paroi libre du VD et du RVOT sont pratiquement similaires pour les APD₂₀ (A et B) et les APD₈₀ (C et D). Il n'y a pas de différence au niveau des pentes maximales de restitution. * $P < 0,05$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 6$ cœurs de cochons sains.

Stimulation de la paroi libre du VD sub-endocardique :

Après une stimulation de la paroi libre du VD sub-endocardique sur une gamme de fréquence de 1 (1000 ms) à 5 Hz (200 ms) avec une incrémentation de 0,5 Hz, nous observons que les APDs enregistrés au niveau de la surface EPI sont significativement plus courts au sein du RVOT par rapport au VD (**Figure 72A et C**). En effet, les APD₂₀ mesurés au sein du RVOT EPI aux fréquences de 1 ; 1,5 ; 3,5 et 4 Hz sont plus courts en comparaison de la paroi libre du VD (**Figure 72A**). Il en est de même pour les APD₈₀ enregistrés aux fréquences de stimulation de 1 ; 1,5 ; 3,5 et 4,5 Hz (**Figure 72C**). Néanmoins, les courbes de restitution des APD₂₀ et APD₈₀ ne sont pas plus pentues au sein du VD par rapport au RVOT (**Figure 72A et C**).

Au niveau de la face sub-endocardique, les courbes de restitution du RVOT et du VD se superposent suggérant l'absence de différence d'APDs (**Figure 72B et D**). Cependant, il est observé une différence uniquement aux fréquences de 2,5 et 3 Hz avec des APD₂₀ respectivement plus longs de 10% et 13% au sein du RVOT ENDO (**Figure 72B**). Aucune différence significative au sein des pentes maximales des courbes de restitution des APD₂₀ (**Figure 72B**) et des APD₈₀ (**Figure 72D**) ne sont observées.

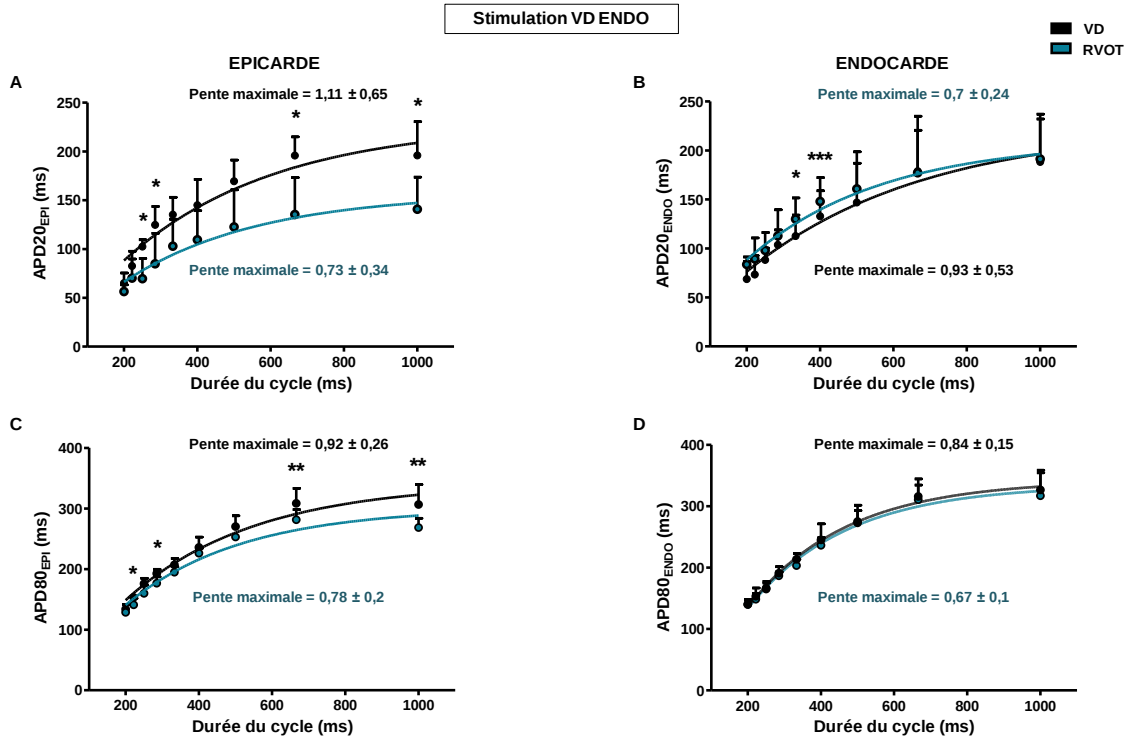


Figure 72. Stimulation de la paroi libre du VD ENDO : Courbes de restitution dynamique sub-épicaudique et sub-endocardique des APD_{20} et des APD_{80} de la paroi libre du VD et du RVOT. Représentation des courbes de restitution des APD_{20} EPI (A) et ENDO (B) ainsi que des APD_{80} EPI (C) et ENDO (D) après une série de stimulation au niveau de l'ENDO de la paroi libre du VD à différentes fréquences, allant de 1 à 5 Hz (période correspondant de 1000 ms à 200 ms). Les pentes maximales de restitution APD_{20} et APD_{80} pour chaque courbe sont calculées pour les faces EPI et ENDO. Les courbes de restitution sub-épicaudiques sont significativement différentes pour les APD_{20} (A) et les APD_{80} (C). Les courbes de restitution sub-endocardiques sont pratiquement similaires pour les APD_{20} (B) et les APD_{80} (D). Il n'y a pas de différence au niveau des pentes maximales de restitution. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 6$ cœurs de cochons sains

d) Expression des canaux potassiques

L'analyse par RT-PCR montre une altération de l'expression des gènes codant pour les canaux potassiques au sein du RVOT EPI par rapport à la paroi libre du VD (**Figure 73A**). L'expression des gènes *KCND3* et *KCNH2* codant respectivement pour les canaux $K_v4.3$ et $K_v11.1$ est significativement 1,8 et 1,7 fois plus importante au sein de la face EPI du RVOT par rapport au VD. Le niveau d'expression des canaux potassiques est similaire entre le RVOT et le VD provenant des faces ENDO (**Figure 73B**). Seul le taux d'ARNm du gène *KCND2* codant pour le canal $K_v4.2$ est 1,4 fois plus faible au sein du RVOT en comparaison au VD.

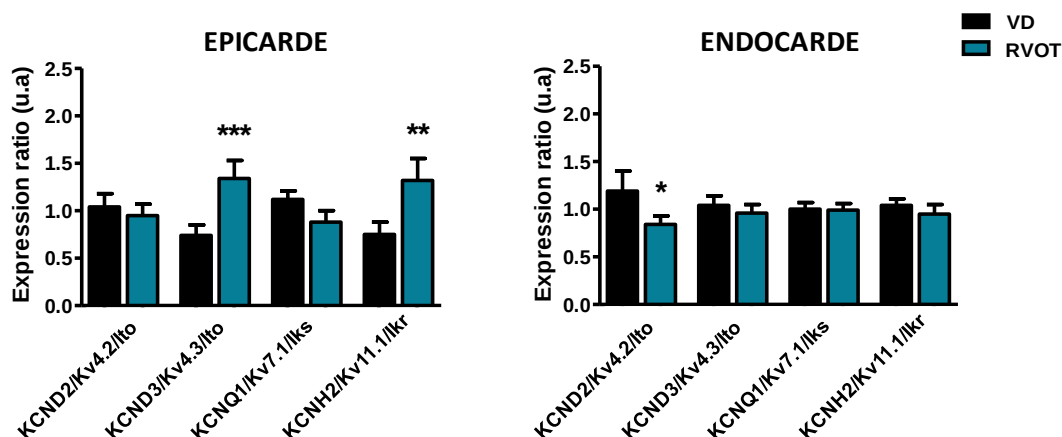


Figure 73. Expression des ARNm des canaux potassiques cardiaques au sein du VD. Représentation des taux d'ARNm des canaux $K_{v4.2}$ - $K_{v4.3}$, $K_{v7.1}$ et $K_{v11.1}$ responsables respectivement des courants $I_{to,f}$, I_{Ks} et I_{Kr} provenant des faces EPI (A) et ENDO (B) de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) par RT-PCR. L'expression des ARNm de $K_{v4.3}$ et $K_{v11.1}$ est significativement plus élevée au sein du RVOT EPI par rapport à la paroi libre du VD EPI. Aucune différence de niveau d'expression des canaux potassiques n'est observée au sein de l'ENDO sauf pour le canal $K_{v4.2}$. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (VD versus RVOT), $N = 4$ cœurs de cochons sains. L'expression des ARNm a été normalisée à celle des gènes de ménage HRPT1 et GUSB. (Résultats obtenus par Sabine Charron).

e) Gradient transmural

Après une stimulation de 1 Hz au sein du RVOT ENDO, nous n'observons pas de différence significative des gradients transmuraux au sein du RVOT et du VD (**Figure 74A**). Par contre, après une stimulation du VD ENDO de 1 Hz, nous remarquons la présence d'un gradient transmural au sein du RVOT qui est absent au niveau de la paroi libre du VD (**Figure 74B**).

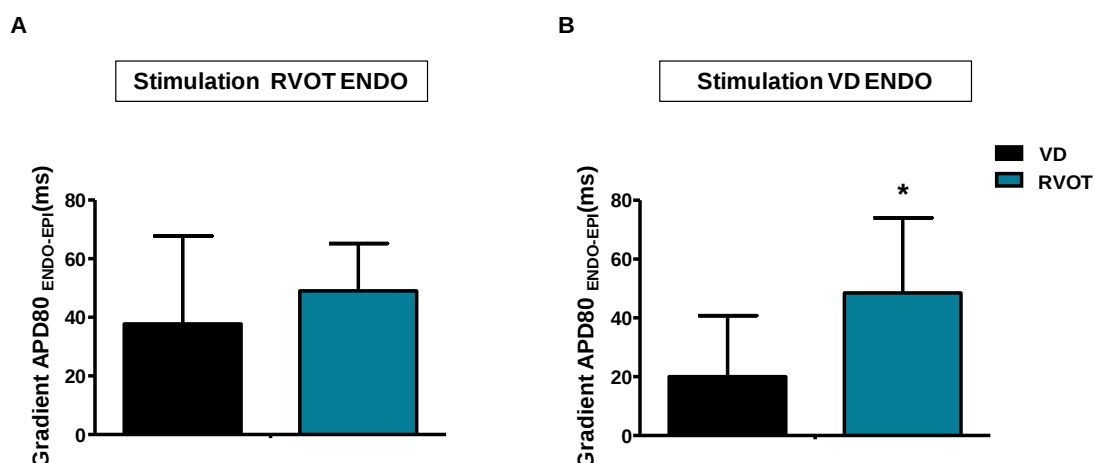


Figure 74. Gradient transmural. Représentation des gradients transmuraux correspondant à la différence des APD_{80} mesurés sur les surfaces ENDO et EPI pour la même région donnée après une stimulation de 1 Hz du RVOT ENDO (A) et de la paroi libre du VD ENDO (B). Un gradient transmural est observé au niveau du RVOT mais inexistant au sein du VD à la suite d'une stimulation du VD ENDO. * $P < 0,05$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 6$ cœurs de cochons sains.

2. Propriétés d'activation

La propagation de l'onde électrique au travers de la surface myocardique du VD est quantifiée à l'aide de cartes d'activation réalisées avec un intervalle de 5 ms pour les isochrones reliant les pixels possédant le même temps d'activation. La carte d'activation obtenue après une stimulation du RVOT EPI à la fréquence de 1 Hz (**Figure 75**) montre un pincement des isochrones (flèches blanches) synonyme d'un ralentissement des VC entre le VD et le RVOT. Cette ligne de conduction lente entre le VD et le RVOT est présente quelque soit le site de stimulation (**Figure 75 et Figure 76A**).

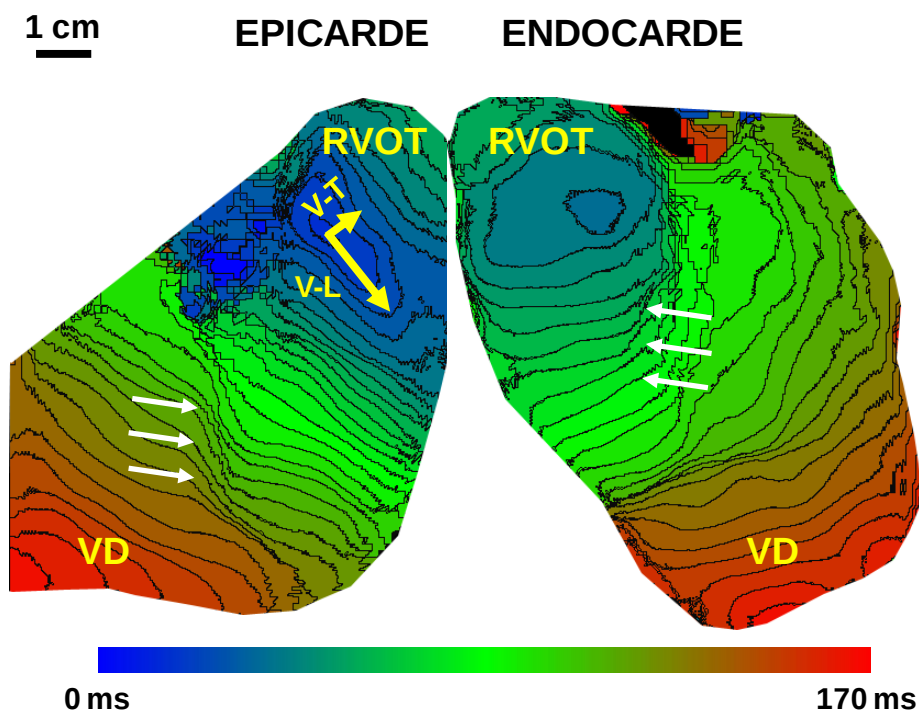


Figure 75. Carte d'activation sub-épicaudique et sub-endocardique du VD. Représentation de cartes d'activation du VD EPI (gauche) et ENDO (droite) obtenues après une stimulation du RVOT EPI à 1 Hz. La zone en bleu représente les régions du myocarde ventriculaire possédant une activation précoce, et la zone en rouge montre les régions activées tardivement. Les lignes noires délimitent des espaces appelés isochrones de 5 ms, reliant les pixels possédant le même temps d'activation. Les flèches jaunes V-T et V-L indiquent respectivement les sens de propagation lent et rapide de l'onde électrique à partir du site de stimulation. Les flèches blanches correspondent à des régions de conductions lentes.

3. Vitesses de conduction

Grâce aux cartes d'activation, il a pu être mesuré les vitesses de conduction longitudinales (V_L) et transversales (V_T) à partir de l'origine de l'onde de dépolarisation (**Figure 76A**). A la fréquence de stimulation de 1 Hz, les V_L EPI (**Figure 76B**) et ENDO (**Figure 76C**) sont significativement plus lentes, respectivement de 10% et 21% au sein du

RVOT en comparaison à la paroi libre du VD. La V_T est significativement réduite de 22% au niveau du RVOT par rapport au VD en EPI mais pas en ENDO (**Figure 76B et C**). Cependant, nous n'observons pas de différence significative sur l'altération de l'anisotropie au niveau de l'EPI (**Figure 76B**) et de l'ENDO (**Figure 76C**).

Ces différences de VC entre le RVOT et la paroi libre du VD sont conservées dans une gamme de fréquence de 1 à 5 Hz comme en témoigne les courbes de restitution des faces EPI (**Figure 77A**) et ENDO (**Figure 77B**).

L'analyse par RT-PCR montre une altération de l'expression des gènes *SCN5A* et *Gja1* codant respectivement pour le canal $Na_v1.5$ (**Figure 78A**) et la Cx43 (**Figure 78B**) au sein du RVOT EPI et ENDO.

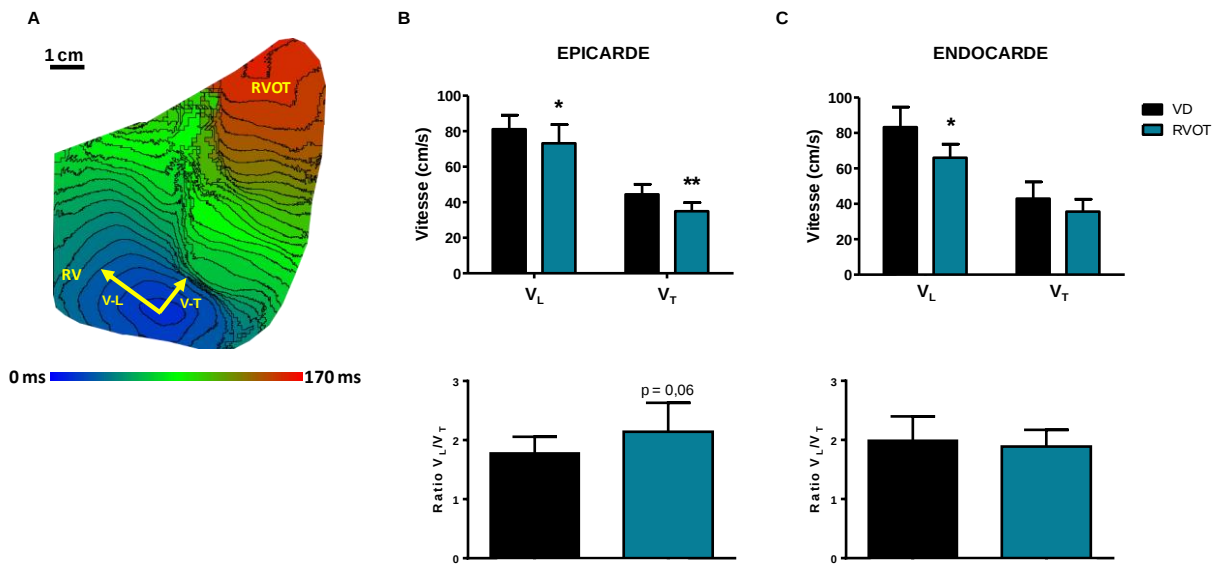


Figure 76. Vitesses de conduction du VD à 1 Hz. Représentation d'une carte d'activation du VD EPI après une stimulation de la paroi libre sub-épicaudique du VD à 1 Hz (**A**). Les flèches jaunes V-T et V-L indiquent respectivement les sens de propagation lent et rapide de l'onde électrique à partir du site de stimulation. Les isochrones sont espacés de 5 ms. Les V_L et V_T mesurées à 1 Hz en EPI (**B**) et ENDO (**C**) sont plus lentes au niveau du RVOT par rapport à celles du VD. Le ratio de la vitesse longitudinale sur la vitesse transversale (V_L/V_T) ne varie pas entre le RVOT et la paroi libre du VD pour les faces EPI (**B**) et ENDO (**C**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 6-7$ cœurs de cochons sains.

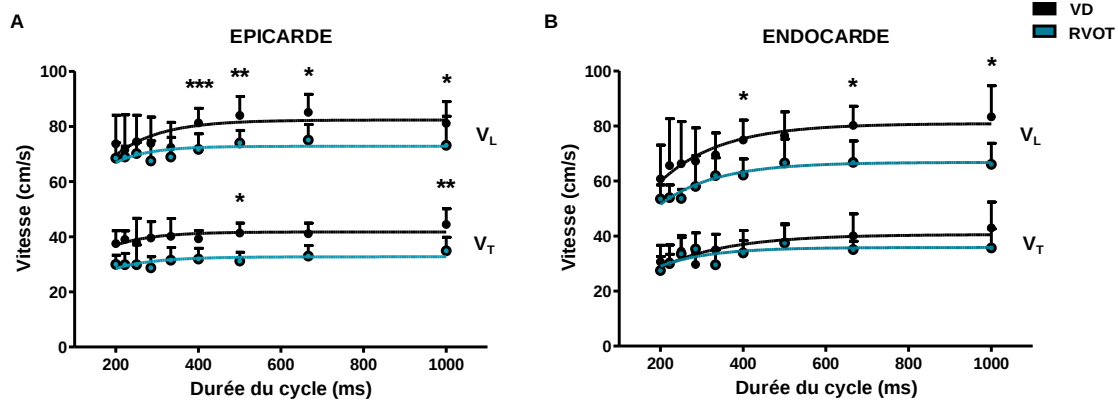


Figure 77. Courbe de restitution des vitesses de conduction au sein du VD. Représentation des vitesses de conduction longitudinale (V_L) et transversale (V_T) enregistrées au sein de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) des faces EPI (A) et ENDO (B) à différentes fréquences de stimulation. Les différences entre les deux régions sont conservées pour les V_L EPI lors des variations de fréquences de stimulation. * P < 0,05 ; ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 (paroi libre du VD versus RVOT), N = 6-7 cœurs de cochons sains.

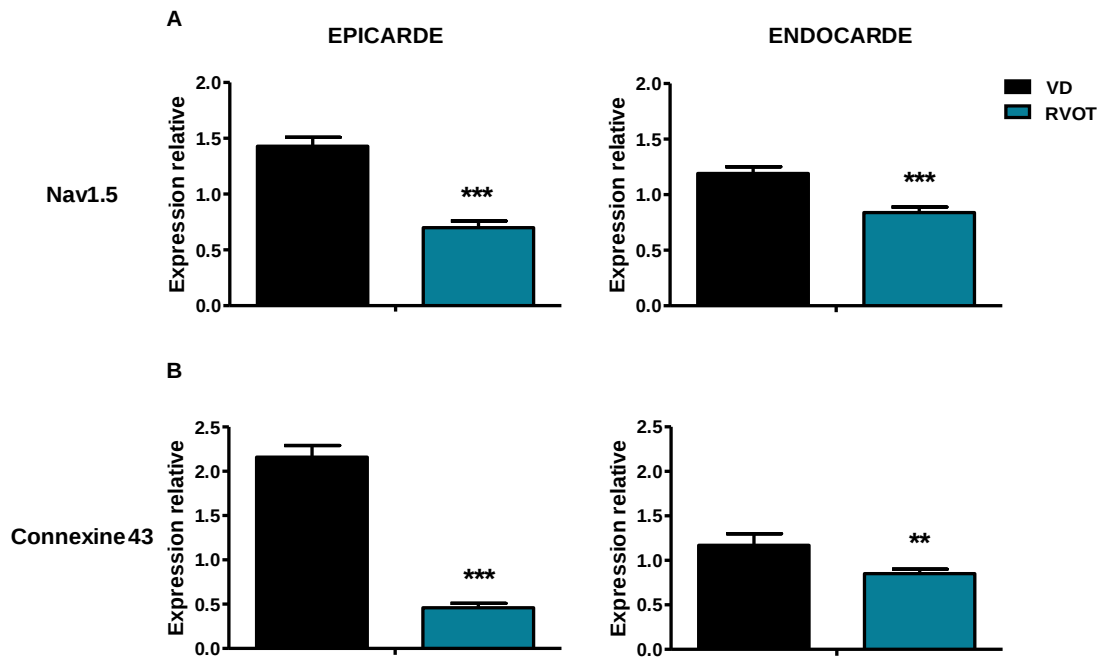


Figure 78. Expression des ARNm de $Na_v1.5$ et de la Cx43 au sein du VD. Représentation des taux d'ARNm de $Na_v1.5$ (A) et de la Cx43 (B) provenant des faces EPI et ENDO de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) par RT-PCR. L'expression des ARNm $Na_v1.5$ et Cx43 est significativement plus faible pour le RVOT par rapport à la paroi libre du VD. ** P < 0,01 ; *** P < 0,001 (paroi libre du VD versus RVOT), N = 4 cœurs de cochons sains. L'expression des ARNm a été normalisée à celle des gènes de ménage HRPT1 et GUSB. (Résultats obtenus par Sabine Charron).

Des immunomarquages de la protéine Cx43 et de la protéine N-cadhérine ont été réalisés sur des coupes de tissu cardiaque provenant de la paroi libre du VD et du RVOT de cœurs de cochons sains (**Figure 79**). Les protéines Cx43 et N-cadhérine sont marquées respectivement en vert et en rouge. La N-cadhérine est une protéine composant les jonctions adhérentes et permet de localiser les disques intercalaires au sein du tissu.

Les protéines Cx43 et N-cadhérine sont colocalisées préférentiellement au niveau des disques intercalaires (flèches bleues) des cardiomyocytes du VD alors qu'elles sont présentes au niveau de la membrane latérale (flèches orange) des cellules du RVOT.

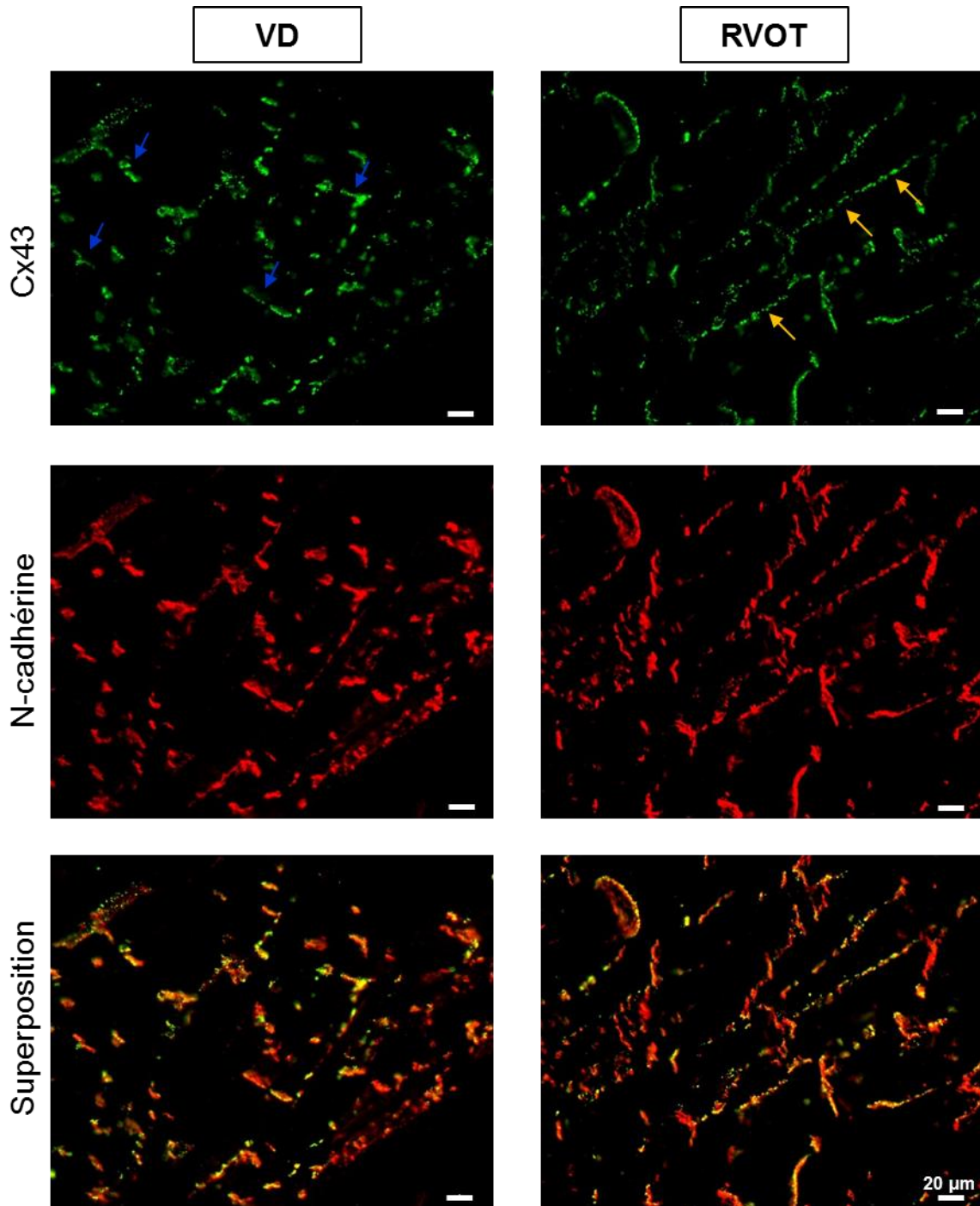


Figure 79. Immunomarquages de la Cx43 et de la N-cadhérine. Les immunomarquages des Cx43 (vert) et N-cadhérine (rouge) sont réalisés sur des coupes de tissus provenant de la paroi libre du VD et du RVOT de cœurs de cochons sains. Au sein de la paroi libre, la Cx43 est colocalisée avec la N-cadhérine principalement au niveau des disques intercalaires (flèches bleues). Au niveau du RVOT, les deux protéines sont également colocalisées sur la membrane latérale (flèches orange) des cardiomyocytes.

4. Composante structurelle du VD

a) Fibrose

Des coupes histologiques de 8 μm d'épaisseur provenant de la paroi libre du VD et du RVOT ont été réalisées dans le sens 1 (**Figure 80A**) et le sens 2 (**Figure 80B**). Après une coloration au trichrome de Masson mettant en évidence le tissu conjonctif, on observe d'importants dépôts de collagène au sein des fibres myocardiques sur les coupes histologiques issues du RVOT. La quantité de collagène a été quantifiée sur des images obtenues à partir de ces coupes histologiques. Ainsi, la quantité de collagène est plus élevée de 25% au sein du RVOT par rapport à la paroi libre du VD (**Figure 80C**). L'analyse par RT-PCR de l'expression du gène *COL1A1* codant pour le collagène de type 1 montre un taux significativement plus haut de 1,6 fois au niveau du RVOT EPI en comparaison à la paroi libre du VD (**Figure 80D**). Ces résultats montrent une composante structurelle différente au sein du RVOT.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

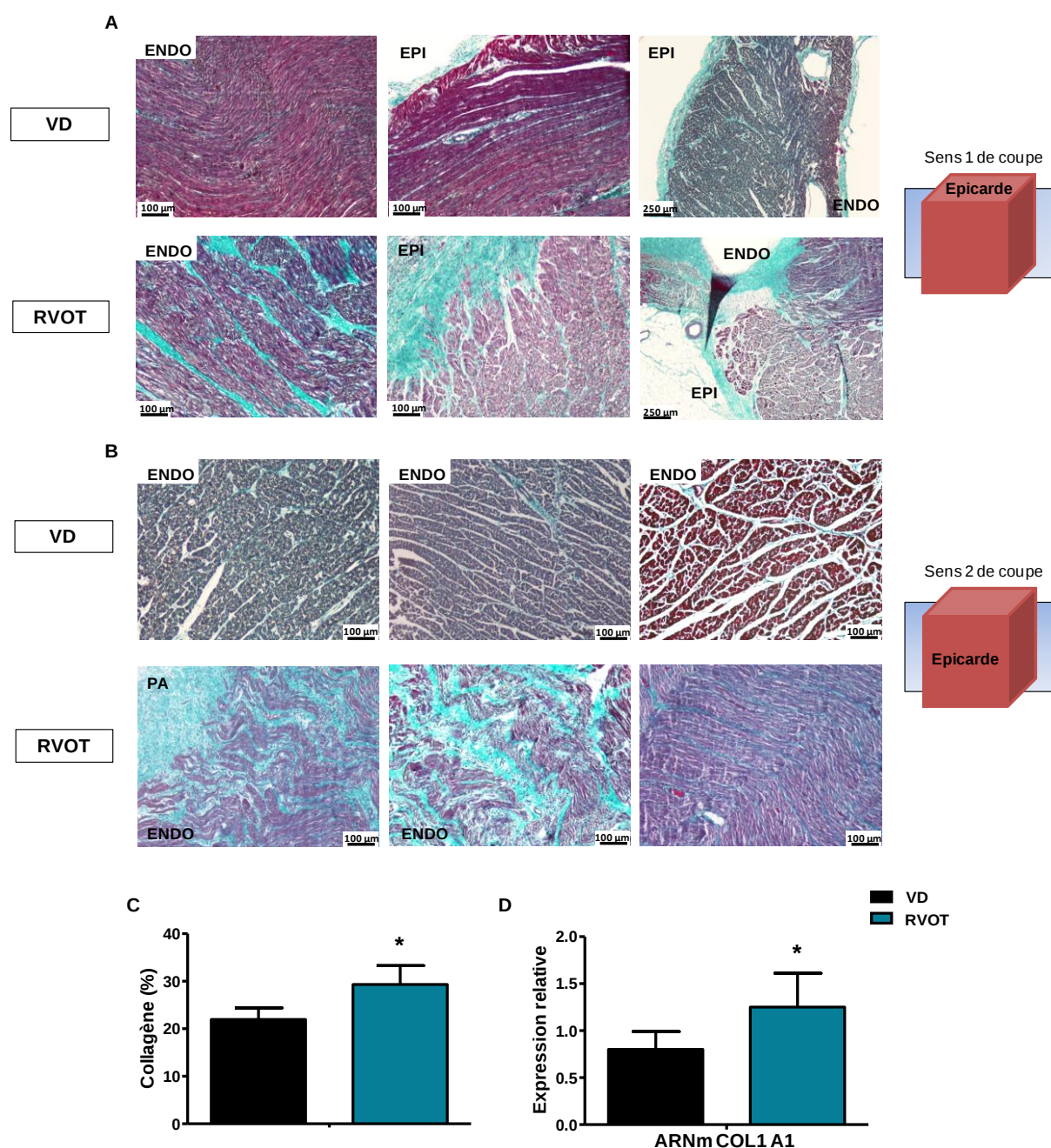


Figure 80. Fibrose. Mise en évidence de la fibrose interstitielle au sein du RVOT sur des coupes de tissu d'une épaisseur de 8 μ m dans le sens 1 (**A**) et dans le sens 2 (**B**). La quantification du collagène montre un contenu significativement plus important au sein du RVOT (bleu) que de la paroi libre du VD (noir) (**C**). L'évaluation par RT-PCR de l'expression du gène *COL1A1* codant pour le collagène de type 1 montre une expression plus importante au sein du RVOT par rapport à la paroi libre du VD (**D**). * $P < 0,05$ (paroi libre du VD versus RVOT), $N = 4$ cœurs de cochons sains. L'expression des ARNm a été normalisée à celle des gènes de ménage HRPT1 et GUSB. (Résultats obtenus par Sabine Charron).

b) Tissu adipeux

Au sein des coupes histologiques provenant de l'infundibulum pulmonaire, nous avons observé une infiltration de tissu graisseux se présentant sous forme de chapelet de cellules ovales de couleur blanche (**Figure 81A et Figure 82**). Cette « graisse ectopique » est présente en proportion plus importante au sein du RVOT par rapport au VD comme en témoigne le marquage des lipides par l'ORO (**Figure 81B**).

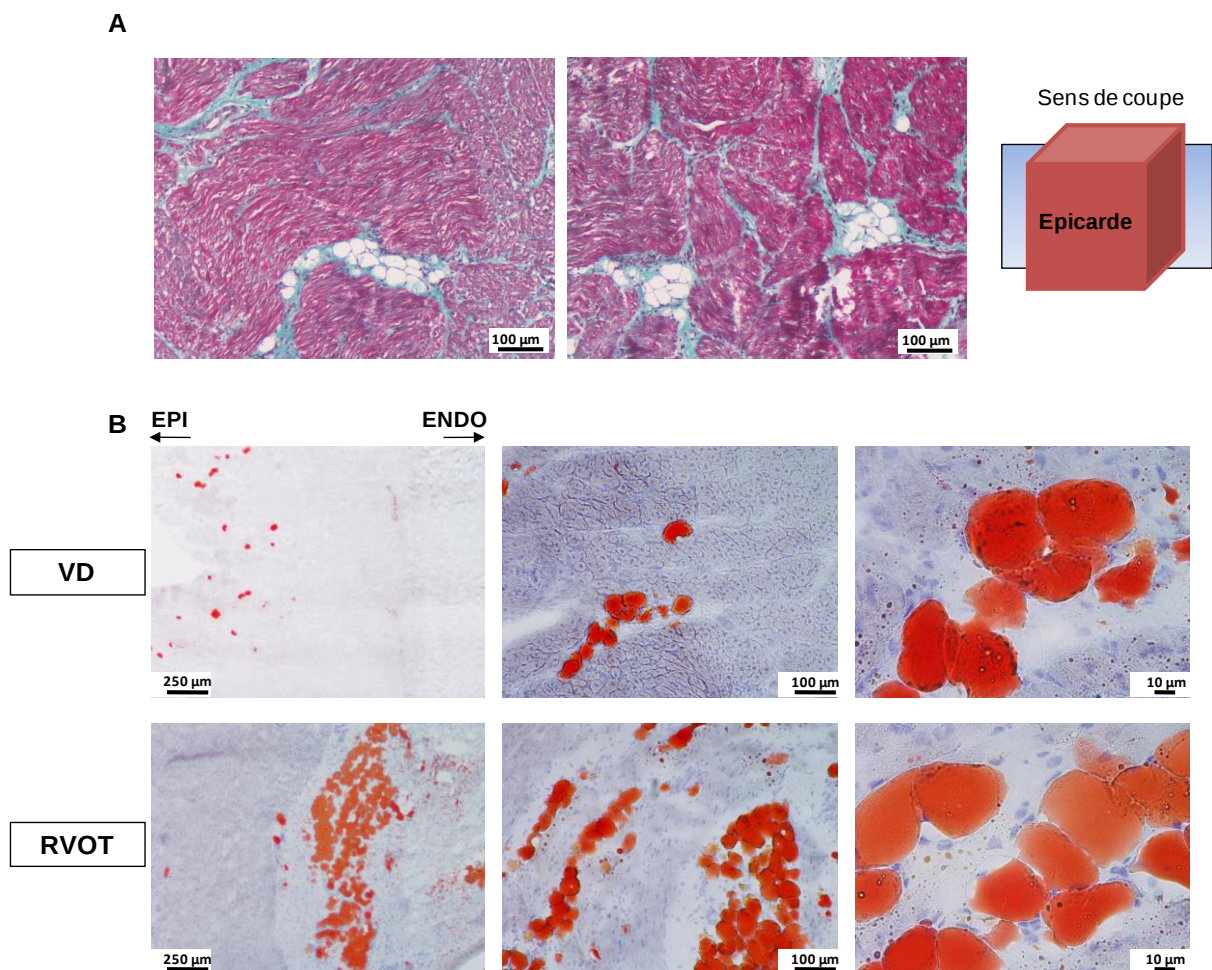


Figure 81. Adipose focale. Mise en évidence sur des coupes de tissu de 8 µm d'épaisseur, de dépôts de tissu adipeux plus importants au sein du RVOT (**A**). Un marquage des lipides à l'ORO est réalisé sur des coupes de tissu de 12 µm provenant de la paroi libre du VD et du RVOT. Notons la présence d'une quantité non négligeable de tissu adipeux infiltré dans le myocarde du RVOT (**B**).

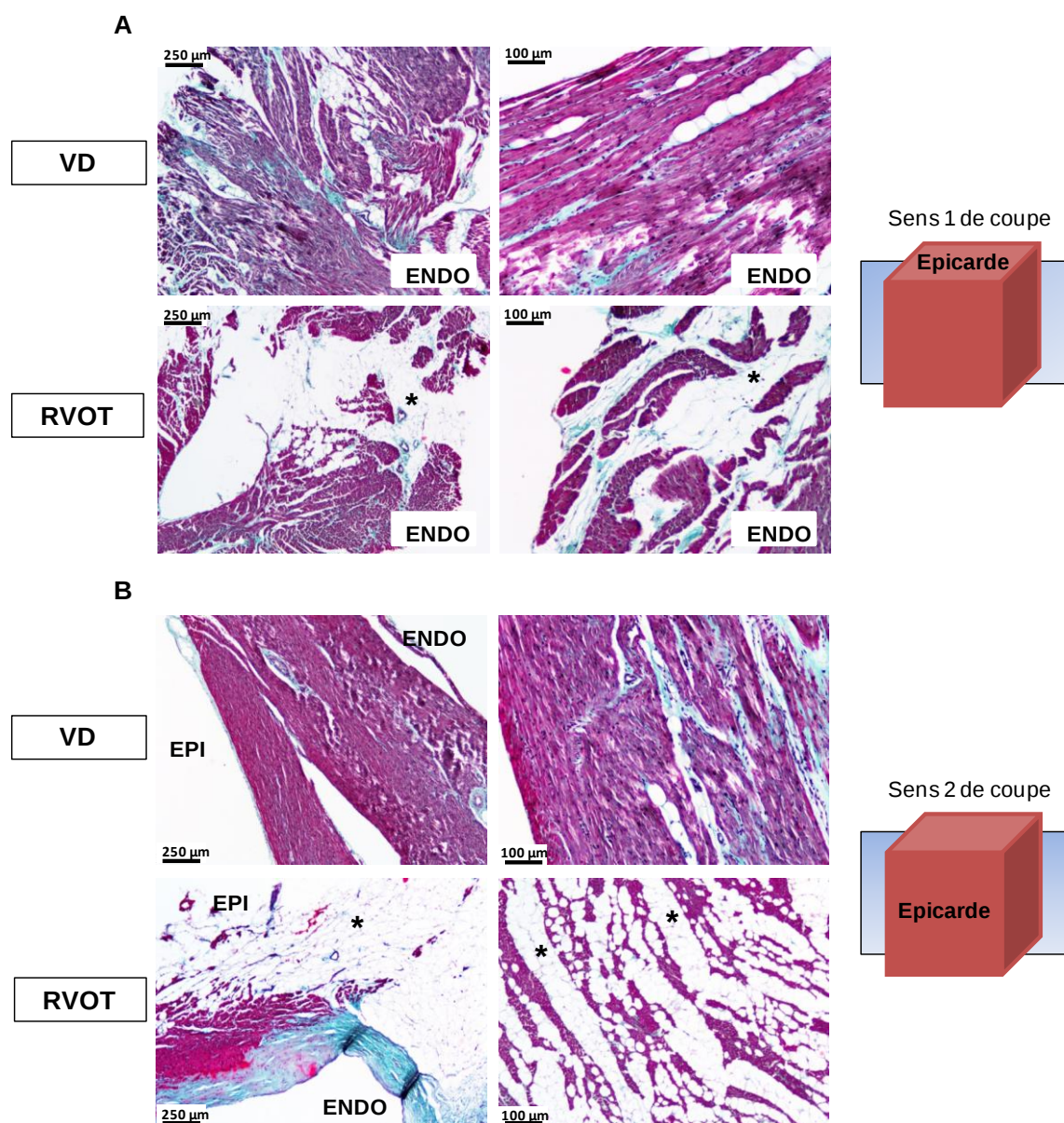


Figure 82. Adipose focale sur cœur humain. Mise en évidence des infiltrations adipeuses (*) au sein du RVOT sur des coupes de tissu de cœur humain d'une épaisseur de 8 μ m dans le sens 1 (A) et dans le sens 2 (B) après un marquage au trichrome de Masson.

c) Orientation des fibres myocardiques

L'observation des coupes histologiques provenant du RVOT révèle la présence d'un changement abrupte d'orientation des fibres myocardiques entre les couches sub-épiscopardiques et sub-endocardiques du RVOT (**Figure 83**). En effet, dans les couches sub-épiscopardiques les fibres sont circonférentielles alors qu'elles sont orientées perpendiculairement aux fibres épiscopardiques au niveau de la face sub-endocardique. Au sein de la paroi libre du VD, les fibres myocardiques sont disposées dans le même sens.

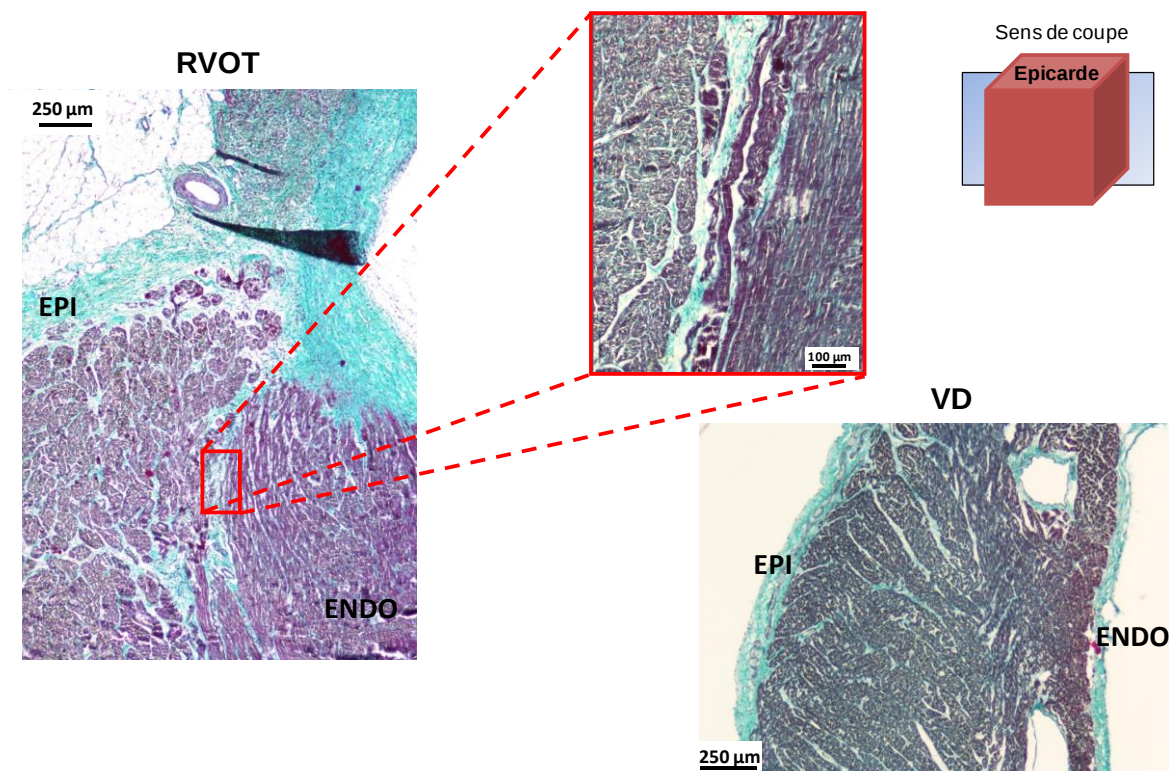


Figure 83. Orientation des fibres myocardiques. Mise en évidence de l'orientation des fibres myocardiques sur des coupes de tissu d'une épaisseur de 8 µm. Notons la présence d'un changement d'orientation des fibres myocardiques entre la surface sub-épiscopardique et sub-endocardique du RVOT par rapport à la paroi libre du VD où l'orientation reste transmuralemement homogène.

5. Caractéristiques à l'échelle cellulaire

a) Taille des cellules

Les cardiomyocytes issus du RVOT possèdent une morphologie différente des cellules provenant de la paroi libre du VD (**Figure 84A**). En effet, les cellules myocardiques du RVOT ENDO sont plus larges de 13% par rapport aux cellules du VD ENDO (**Figure 84C**). A propos des cardiomyocytes RVOT EPI, ils sont plus longs et plus larges respectivement de 11% et de 23% par rapport aux myocytes du VD EPI (**Figure 84B et C**). Cependant, aucune augmentation significative du ratio largeur sur longueur n'est observée (**Figure 84D**).

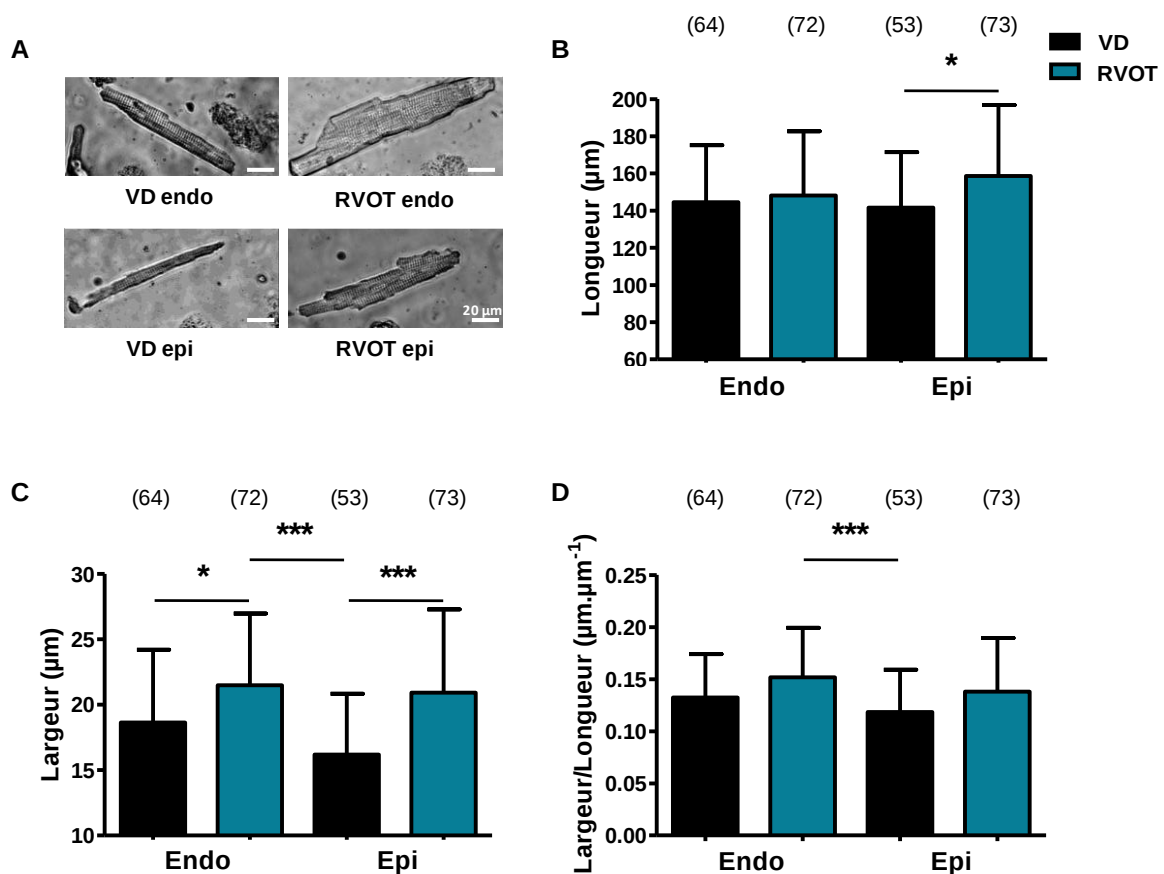


Figure 84. Morphologie cellulaire. La longueur (**B**) et la largeur (**C**) des cellules provenant des couches sub-épicaudiques et sub-endocardiques de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) sont mesurées. Notons que les cardiomyocytes issus des couches RVOT ENDO sont plus larges que les cellules de la paroi libre du VD ENDO. Les cardiomyocytes ventriculaires des couches EPI sont plus longs et plus larges au niveau du RVOT que de la paroi libre du VD. Il n'y a pas d'augmentation du ratio largeur sur longueur (**D**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (paroi libre du VD versus RVOT). Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules analysées sur une totalité de $N = 4$ cœurs de cochons sains.

b) Tubules Transverses

L'organisation du réseau de tubules T dans les cardiomyocytes RVOT issus des faces sub-épicaudiques et sub-endocardiques des cœurs sains est similaire à celle observée dans les myocytes de la paroi libre du VD. Les striations représentant les tubules T apparaissent régulières et organisées au sein des cellules RVOT et de la paroi libre du VD (**Figure 85A**).

La densité de puissance de la transformée de Fourier (FFT) est similaire entre les myocytes provenant du RVOT et du VD des couches EPI et ENDO (**Figure 85C**). L'espacement des tubules T reste similaire dans les quatre groupes cellulaires (**Figure 85B**).

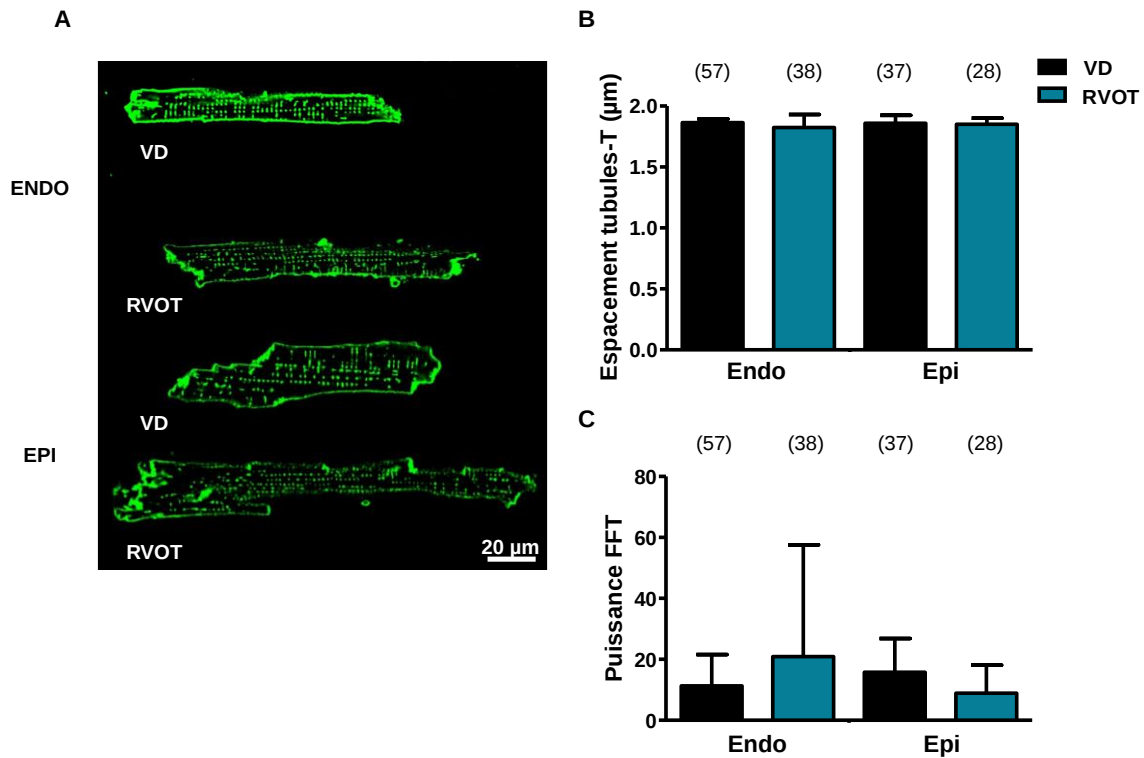


Figure 85. Organisation du réseau de tubules T. Représentation d'images obtenues en microscopie confocale de cardiomyocytes provenant des couches sub-épicaudiques et sub-endocardiques de la paroi libre du VD et du RVOT isolés de cœurs de cochons sains (**A**). L'espacement entre les tubules T semble similaire au sein des cardiomyocytes des couches EPI et ENDO de la paroi libre du VD et du RVOT (**B**). La densité de puissance de la transformée de Fourier (FFT) ne change pas au sein des différents groupes de cellules (**C**). Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules analysées sur une totalité de N = 8-9 cœurs de cochons sains.

c) Couplage Excitation-Contraction sur cardiomyocytes isolés

Les paramètres contractiles tels que la longueur diastolique des sarcomères (LS) (**Figure 86A**) et l'amplitude de raccourcissement des sarcomères (**Figure 86B**) des cardiomyocytes isolés de la paroi libre du VD et du RVOT sont similaires lors d'une stimulation à 1 Hz. De plus, nous n'observons aucune différence significative concernant le temps pour atteindre le pic systolique (T_{pic} contraction) (**Figure 86C**) et la constante de temps de relaxation (Tau) (**Figure 86D**) entre les cellules des deux régions myocardiques.

Concernant les paramètres des transitoires Ca^{2+} des cardiomyocytes, le Ca^{2+} diastolique est plus faible de 4% dans les myocytes isolés du RVOT ENDO par rapport au VD ENDO (**Figure 87A**) lors d'une stimulation à 1 Hz. L'amplitude des transitoires Ca^{2+} (**Figure 87B**), le temps pour arriver au pic systolique de Ca^{2+} (T_{pic} transitoire Ca^{2+}) (**Figure 87C**) et la constante de temps de décours du transitoire Ca^{2+} (Tau Transitoire Ca^{2+}) (**Figure 87D**) sont identiques entre les cellules provenant du RVOT et du VD en EPI et en ENDO.

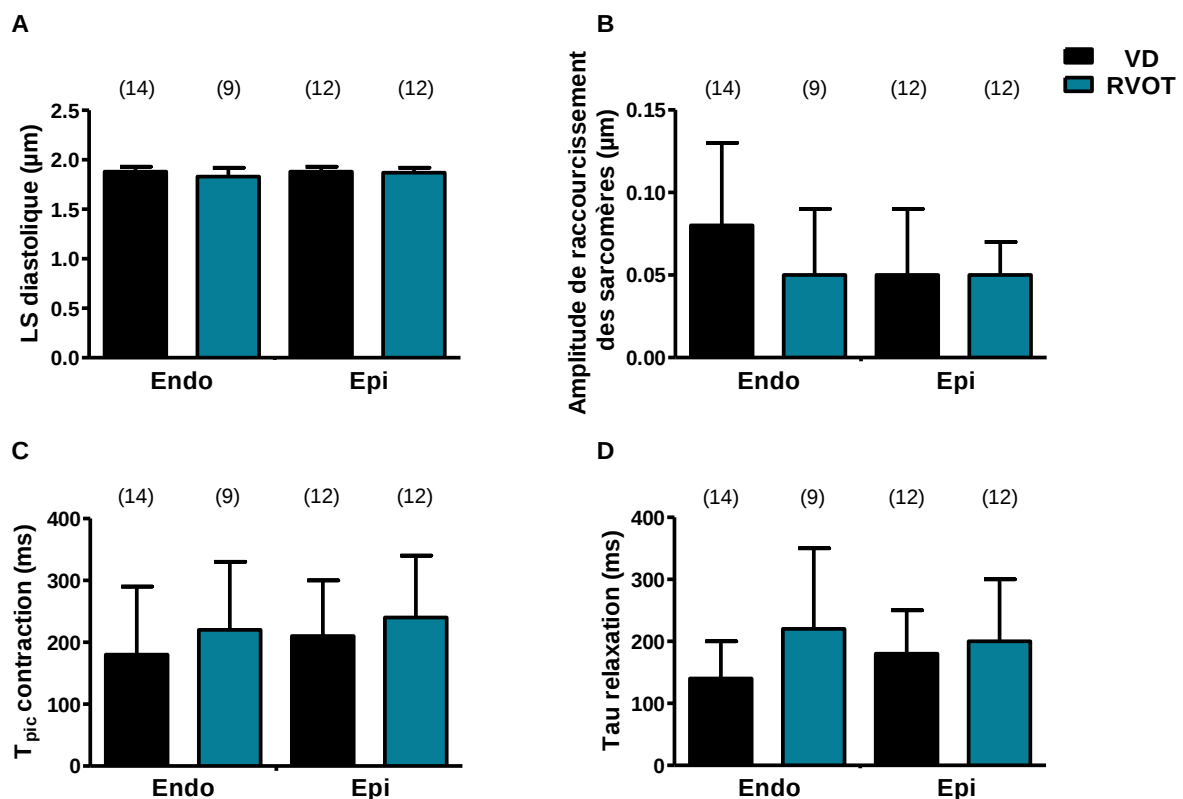


Figure 86. Paramètres contractiles des cardiomyocytes isolés de la paroi libre du VD et du RVOT. Le raccourcissement des cellules est enregistré à 37°C dans des cardiomyocytes chargés au Fura-2 et stimulés à 1 Hz. La longueur diastolique des sarcomères (LS) (A) ainsi que l'amplitude de raccourcissement des sarcomères (B) sont similaires entre les cellules provenant de la paroi libre du VD (noir) et du RVOT (bleu) ENDO et EPI. Au niveau des cinétiques, le temps pour atteindre le pic systolique (C), et la constante de temps de relaxation (Tau) (D) sont analysés et ne montrent aucune différence significative entre les cellules provenant de la paroi libre du VD et du RVOT en EPI et en ENDO. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules analysées sur une totalité de N = 6 cœurs de cochons sains.

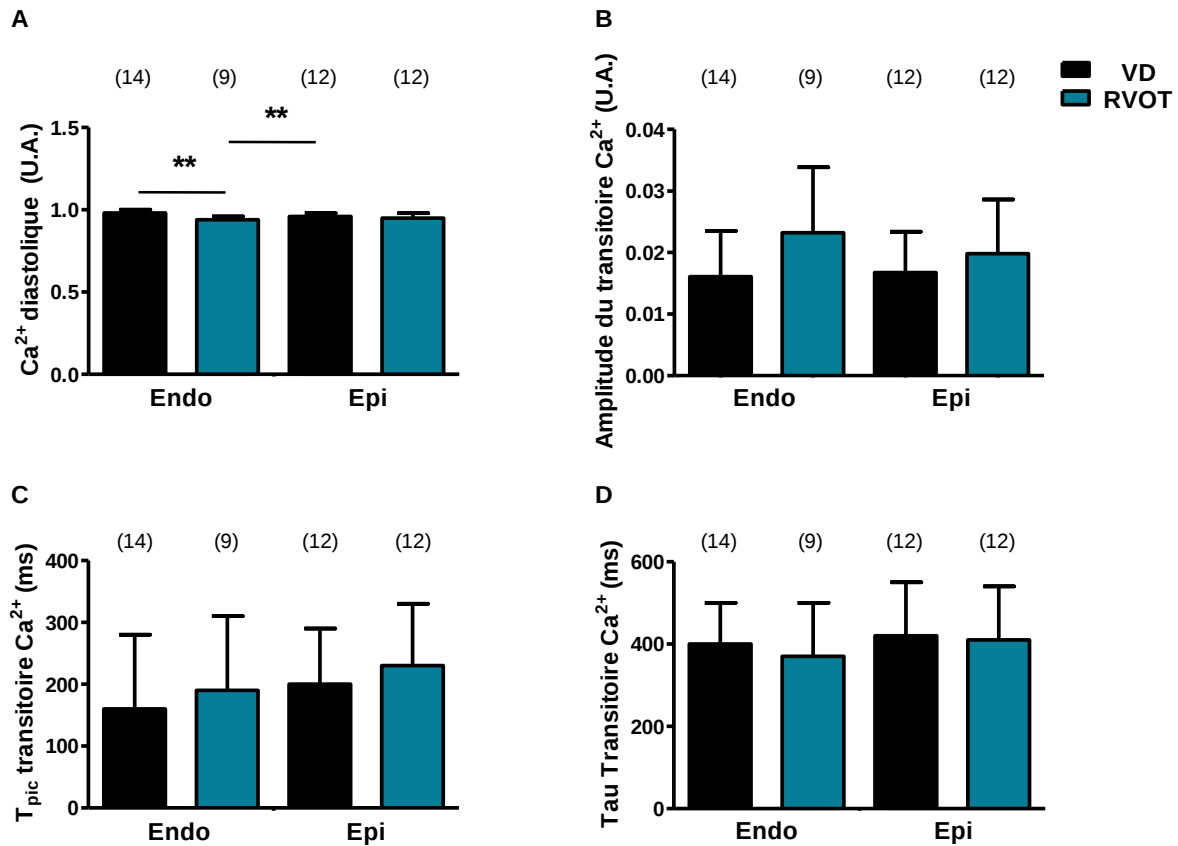


Figure 87. Paramètres des transitoires Ca^{2+} des cardiomyocytes isolés de la paroi libre du VD et du RVOT. Les transitoires Ca^{2+} sont enregistrés à 37°C dans des cellules chargées au Fura-2 et stimulées à 1 Hz. Le Ca^{2+} diastolique est diminué dans les cellules provenant du RVOT ENDO (bleu) par rapport au VD ENDO (noir) (A). L'amplitude des transitoires Ca^{2+} est similaire entre les cellules isolées de la paroi libre du VD et du RVOT ENDO et EPI (B). Les cinétiques des transitoires Ca^{2+} telles que le temps pour arriver au pic systolique de Ca^{2+} (T_{pic} transitoire Ca^{2+}) (C), la constante de temps de décaissement du transitoire calcique (Tau Transitoire Ca^{2+}) (D) ne sont pas différentes entre les divers groupes cellulaires. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (paroi libre du VD versus RVOT). Les chiffres entre parenthèses correspondent aux nombre de cellules analysées sur une totalité de $N = 6$ cœurs de cochons sains.

III/ Discussion des résultats

Les connaissances acquises sur les propriétés électrophysiologiques des ventricules témoignent de la présence d'APDs plus courts au sein du VD en comparaison au VG (Arteyeva *et al.*, 2015). Il a été montré que cette différence était attribuée à une densité de courants I_{to} et I_{Ks} plus élevée dans le VD que dans le VG (Volders *et al.*, 1999). Cependant, les résultats de notre étude témoignent de la présence de propriétés électrophysiologiques distinctes au sein même de la cavité ventriculaire droite et plus précisément entre le RVOT et la paroi libre du VD.

En effet, les enregistrements de MAPs et de PAs optiques révèlent la présence de MAPDs et d'APDs plus courts au niveau de la face sub-épicaudique du RVOT en comparaison à celle du VD. De manière plus détaillée, les MAPD₂₀ ou APD₂₀ EPI assimilés à la phase de repolarisation précoce et les MAPD₈₀ ou APD₈₀ EPI associés à la phase de repolarisation tardive sont plus courts au sein de l'infundibulum pulmonaire. Les diminutions des MAPDs et des APDs peuvent être corrélées à la présence d'un niveau élevé d'ARNm codant pour les canaux K_v4.3 et K_v11.1 responsables des courants potassiques repolarisants I_{to} et I_{Kr}. Une quantification des protéines K_v4.3 et K_v11.1 par western blot ainsi qu'une mesure des courants ioniques I_{to}, I_{Kr} par la technique de patch clamp seront nécessaires afin de confirmer le niveau de régulation et la fonctionnalité des canaux. Ces expériences complémentaires permettraient d'attester que les observations de cartographie optique proviennent d'une plus faible expression des ARNm codant pour les canaux K_v4.3 et K_v11.1.

D'après ces différentes observations, nous pouvons conclure qu'il existe une hétérogénéité de repolarisation au sein de la cavité ventriculaire droite.

Notons que le RVOT sain de cochon, présente des similitudes avec le contexte arythmogène du syndrome de Brugada et notamment l'hypothèse liée aux troubles de repolarisation. L'hypothèse dite de repolarisation repose sur la présence d'un gradient transmural du courant I_{to} prépondérant dans les cardiomyocytes épicaudiques du VD (*Naccarelli and Antzelevitch, 2001*). Les résultats obtenus durant ce projet tels que la dispersion épicaudique de la repolarisation entre la paroi libre du VD et le RVOT ainsi que la dispersion transmurale épi-endocardique de la repolarisation au sein du RVOT illustrent bien cette hypothèse.

Cette hétérogénéité de repolarisation constitue donc un substrat électrophysiologique susceptible de contribuer à l'arythmogénicité de la région RVOT, favorisant ainsi la création d'un circuit réentrant (*Morita et al., 2008*).

De plus, les propriétés de restitution dénotent une différence en fonction du site de stimulation. En effet, lorsqu'une stimulation est effectuée au sein du RVOT sub-endocardique et non au niveau du VD ENDO, on observe une perte de différence des APDs entre le RVOT et la paroi libre du VD. Ce résultat pourrait probablement être expliqué par la modulation électrotonique de la durée du PA.

Nos résultats présentent également des analogies avec l'hypothèse de dépolarisation du syndrome de Brugada, liée à une anomalie structurale et aux troubles de conduction au sein de l'infundibulum pulmonaire (*Meregalli et al., 2005*).

En effet, nous avons observé une conduction lente et discontinue de l'onde de dépolarisation au sein du RVOT dans les cœurs de cochons sains. Ce ralentissement de la propagation de l'activité électrique est associé à un défaut de l'expression du gène *Gja1* codant pour la Cx43 ainsi qu'à une altération de la localisation de la protéine (Kontogeorgis et al., 2008). Effectivement, nous observons un faible niveau d'ARNm codant pour la Cx43 avec une latéralisation de la protéine au sein du RVOT en comparaison à la paroi libre du VD.

Nous avons également décrit une faible activité du gène *SCN5A* par la présence d'un niveau faible de l'ARNm codant pour le canal $\text{Na}_v1.5$ au sein du RVOT sub-épiqueur par rapport au reste du VD. Des études complémentaires sur le niveau d'expression de la protéine $\text{Na}_v1.5$ ainsi que la mesure du courant I_{Na} seront nécessaires afin de vérifier si les troubles de conduction sont liés à une perte de fonction du canal $\text{Na}_v1.5$.

Sur le plan architectural, nous observons une structure spécifique au sein du RVOT caractérisée par une orientation différente des fibres transmurales myocardiques accompagnée d'une infiltration adipeuse et d'un important dépôt de collagène rappelant le phénotype présent dans la DAVD (Basso and Thiene, 2005).

Dans ce contexte, la présence de la fibrose et de l'adipose focale au sein de l'infundibulum pulmonaire sain contribuerait à la génération de blocs de conduction pouvant induire des arythmies (Kawara et al., 2001). Ainsi, la composante architecturale myocardique du RVOT chez le sujet sain participerait à la création d'un substrat anatomique à l'origine des arythmies décrites précédemment dans syndrome de Brugada (Coronel et al., 2005).

Au terme de ce projet, nous pouvons conclure sur l'existence d'une identité propre du RVOT et plus précisément la face sub-épiqueur sur les plans électrique et structurel par rapport au reste du VD. Cette identité serait donc liée à une origine embryologique spécifique du RVOT (Boukens et al., 2009). Par exemple, les gènes de type T-box codant pour certains facteurs de transcription participent à l'expression différentielle de canaux ioniques et des connexines. C'est le cas du facteur de transcription *Tbx2* qui réprime l'expression du gène *Gja1* et contribue à la persistance du phénotype fœtal (Christoffels et al., 2004; Harrelson et al., 2004).

Nos résultats suggèrent que seules les couches sub-épiqueur retiennent le phénotype fœtal.

La région du RVOT possède une structure et des propriétés électrophysiologiques distinctes du reste du VD conduisant à la mise en place d'un substrat pro-arythmique. Toutefois, l'élément déclencheur des arythmies au sein du RVOT est moins évident. En effet,

nos résultats montrent peu de différence concernant le mécanisme de CEC entre les deux régions.

Dans le contexte des TVIs du RVOT, il est fortement suggéré que la stimulation adrénergique intervienne dans l'arythmogénicité (*Lerman et al., 1986*). Les propriétés de régulation calcique seraient donc de base identiques à celles du reste du VD mais pourraient différer en condition de stimulation adrénergique. De plus, nous avons des expériences préliminaires démontrant une arythmogénicité supérieure du RVOT par rapport à la paroi libre en réponse à une stimulation adrénergique au niveau cellulaire et tissulaire.

Deuxième étude : Remodelage pro-arythmique des ventricules droit et gauche dans un modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée

I/ Contexte et objectifs

La tétralogie de Fallot correspond à la cardiomyopathie cyanogène la plus fréquente, elle touche environ 3 naissances sur 1000 (*Apitz et al., 2009*). La TOF est associée à quatre anomalies cardiaques : la sténose pulmonaire, la dextroposition de l'aorte, la CIV et l'hypertrophie du VD. Une réparation chirurgicale complète après la naissance est nécessaire avec une fermeture de la CIV et l'élargissement de l'infundibulum pulmonaire. Elle améliore ainsi la qualité de vie du patient et apporte de bons résultats en termes de survie post-opératoire. Cependant, des études menées sur des cohortes de patients rTOF vieillissants témoignent de la présence de troubles du rythme ainsi qu'un dysfonctionnement du VD pouvant induire à terme une ICD et la mort (*Marie et al., 1992*).

La correction chirurgicale ne garantit pas la pleine restauration de la fonction cardiaque et s'accompagne de cicatrices anatomiques et fonctionnelles pouvant perturber la séquence électromotrice du cœur (*Bove et al., 2014; Vogel et al., 2001*).

Pour mieux comprendre les complications rythmiques qui se majorent dans la population rTOF vieillissante, un modèle porcin mimant les anomalies anatomiques et hémodynamiques rencontrées chez les patients opérés, a été développé par le Professeur Jean-Benoît THAMBO et le Docteur François ROUBERTIE (*Thambo et al., 2012*).

La caractérisation du substrat pro-arythmique est une étape indispensable afin d'optimiser par la suite la prise en charge des patients, et de développer des moyens thérapeutiques permettant de prévenir la survenue d'arythmies létales.

Les travaux présentés ici s'inscrivent dans cet objectif. Ils ont permis de mettre en évidence le remodelage électrophysiologique et structurel des deux ventricules dans ce modèle animal.

II/ Article 1 : le remodelage pro-arythmique du ventricule droit dans un modèle porcin de tétralogie de Fallot réparée.

Pro-Arrhythmic Remodeling of the Right Ventricle in a Porcine Model of Repaired Tetralogy of Fallot

David Benoist, PhD^{1,2*}; Virginie Dubes, MSc^{1,2*}; François Roubertie, MD^{1,2,3}; Stephen H. Gilbert, PhD^{1,2,4}; Sabine Charron, MSc^{1,2}; Marion Constantin, MSc^{1,2}; Delphine Elbes, PhD^{1,2,5}; Delphine Vieillot, TA⁶; Bruno Quesson, PhD^{1,2}; Hubert Cochet, MD, PhD^{1,2,3}; Michel Haïssaguerre, MD^{1,2,3}; Caroline Rooryck, MD, PhD⁷; Pierre Bordachar, MD, PhD^{1,2,3}; Jean-Benoit Thambo, MD, PhD^{1,2,3}; Olivier Bernus, PhD^{1,2}

¹IHU LIRYC, L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque, Fondation Bordeaux Université, Bordeaux, France

²Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Hôpital Cardiologique du Haut-Lévêque, Pessac, France

⁴Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

⁵University of Oxford, Institute of Biomedical Engineering, Oxford, United-Kingdom

⁶Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Université de Bordeaux, Pessac, France

⁷E.A. 4576, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* These authors contributed equally to this work.

Short Title: Pro-arrhythmic substrate in repaired TOF

Corresponding author: Dr. David Benoist

IHU LIRYC
PTIB - Hôpital Xavier Arnozan
Avenue Haut Leveque
33604 Pessac
France
Email : david.benoist@u-bordeaux.fr
[Phone : +33\(0\)5 35 38 19 68](tel:+33535381968)
[Fax: +33 \(0\)5 57 10 28 69](tel:+33557102869)

Word count: 6977

Abstract

Aims – The growing adult population with surgically-corrected tetralogy of Fallot (TOF) is at risk of developing arrhythmias and sudden cardiac death in the long term. The structural and electrophysiological remodeling of the right ventricle (RV) may contribute to arrhythmia generation in these patients. Here, we investigate this remodeling in a large animal model reproducing TOF post-operative features.

Methods and Results – Pigs mimicking repaired TOF (rTOF) underwent cardiac MRI functional characterization and presented with pulmonary regurgitation, RV hypertrophy, dilatation and dysfunction compared to Sham-operated animals (Sham). Optical mapping of rTOF RV-perfused wedges revealed a significant prolongation of RV activation time with slower conduction velocities and regions of conduction slowing well beyond the surgical scar. A reduced Connexin-43 protein expression and a remodeling of extracellular matrix-related gene expression were found in rTOF RVs, with an increase in collagen content that correlated with prolonged RV activation time. RV action potential duration (APD) was prolonged in the epicardial anterior region at early and late repolarization level, thus contributing to a greater APD heterogeneity and to altered transmural and antero-posterior APD gradients in rTOF RV. APD remodeling involved changes in the expression of Kv4.3 and MiRP1. Spontaneous arrhythmias were more frequent in rTOF wedges and more complex in the anterior than in the posterior RV.

Conclusions – Significant remodeling of RV conduction and repolarization properties was found in an animal model of repaired TOF with RV overload and dysfunction. This remodeling generates a pro-arrhythmic substrate likely to contribute to sudden cardiac death in rTOF patients.

Keywords: Tetralogy of Fallot; right ventricle; arrhythmia; remodeling; conduction

Introduction

Tetralogy of Fallot (TOF) is the most frequent cyanotic congenital heart defect with a prevalence of 3.5 per 10,000 births (Egbe et al., 2014). Over the last decades, improvements in the timing and approach of surgical correction have considerably improved survival to adulthood. However, the adult survivor population is at risk of developing sustained ventricular arrhythmias and sudden cardiac death (SCD) late after surgery, with a respective incidence of 11.9 % and 8.3% 35 years after repair (Gatzoulis et al., 2000a).

The role of scar regions due to right ventriculotomy and ventricular septal defect repair in supporting macroreentry circuits and monomorphic ventricular tachycardia (VT) is well established (Downar et al., 1992; Khairy and Stevenson, 2009; Zeppenfeld et al., 2007). Procedural success of radiofrequency ablation remains challenging (Morwood et al., 2004) but recent studies targeting well-defined isthmuses appeared promising (Kapel et al., 2015; Zeppenfeld et al., 2007).

In the context of SCD, there is evidence for the implication of RV volume and pressure overload in sustained ventricular arrhythmias in repaired Fallot patients (Helbing et al., 2002; Marie et al., 1992). QRS interval prolongation and dispersion are well-documented predictors of ventricular arrhythmias among corrected adult patients and have been linked to RV dilatation (Gatzoulis et al., 1995). Moreover, it has been suggested that RV unloading secondary to pulmonary valve replacement may prevent a worsening of these markers and when associated with intraoperative cryoablation, reduce ventricular arrhythmia incidence (Therrien et al., 2001). Global heterogeneity of repolarization, measured as QTc or JTc dispersion, was also found increased in patients with repaired TOF and was considered as a useful marker to refine arrhythmic risk stratification (Gatzoulis et al., 1997; Helbing et al., 2002).

Previous studies have suggested that RV overload may lead to a ventricular remodeling likely to enhance the risk of sustained ventricular arrhythmias, as commonly reported in heart failure (Coronel et al., 2013). We aimed at characterizing this remodeling in the RV of a porcine model mimicking TOF post-operative lesions which was previously established in our laboratory (Thambo et al., 2012). A better understanding of the electrophysiological and structural substrates late after TOF repair appear an essential first step in investigating and developing novel specific anti-arrhythmic therapeutic approaches.

Methods

An expanded Methods section is available in the Online Data Supplement.

All experiments were in line with the European Union Council Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes and with local ethical committee approval.

Animal Model

The animal model of repaired TOF (rTOF N=7) was produced as previously described (Thambo et al., 2012). Briefly, Large White piglets (< 12kg) were pre-medicated with ketamine (10 mg/kg, IM, Vibrac) and acepromazine (0.1 mg/kg, Vetoquinol). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (5 mg/kg, IV, Ceva) and maintained with isoflurane (2% in 100% O₂, Vibrac) after endotracheal intubation. Following left lateral thoracotomy, 2 pulmonary valve leaflets were excised; a PTFE patch was sewn across the pulmonary annulus and pulmonary artery banding was performed using a loose-tied tape. For sham-operated animals, only the lateral thoracotomy was performed (Sham N=5). Cardiac function and remodeling was assessed 23 ± 1 weeks post-surgery as detailed below.

Cardiac Magnetic Resonance Imaging

Pigs were pre-medicated and anaesthetized as described above. A conventional cardiac magnetic resonance (CMR) examination was carried out as described in Bogaert et al (Bogaert, 2012), using a Siemens Magnetom Avanto 1.5T MRI scanner (Erlangen, Germany). All images were taken during

end-expiratory ventilation stop. Right-ventricular short-axis TrueFISP cine-image stacks and phase-contrast MRI were obtained under manual-breathhold. CMR analysis was performed by a single investigator. Quantification of ventricular function was carried out using the Siemens syngo ARGUS Ventricular Function software package.

Euthanasia, cardiac harvesting and tissue collection

Following a median sternotomy to expose the heart, anesthetized animals received an intravenous dose of heparin (200 UI/kg, PanPharma) and were euthanized by injection of sodium pentobarbital (10 ml from 200 mg/ml stock). The heart was quickly excised, the aorta cannulated and the myocardium flushed with an ice-cold cardioplegic solution. The heart and, after careful dissection, the RV wall were weighed. Samples were dissected out from the anterior RV epi- and endocardium and snap-frozen into liquid nitrogen for molecular biology studies and kept at -80°C until use.

Optical mapping of cardiac electrical activity

The right coronary artery was cannulated at the ostium level and perfused with cardioplegic solution while suturing major arterial leaks. The RV was installed in a chamber, immersed and perfused (20 mL/min) with a modified Krebs-Henseleit solution (37°C). The preparation was electrically stimulated in the mid-free wall region. Contraction was abolished using the electro-mechanical uncoupler blebbistatin (10 µM, Enzo Life Sciences) before loading with a 10 µM bolus of di-4-ANEPPS (Biotium). Fluorescent signals were recorded subsequently from the epi- and endocardial surfaces at 1 kHz using a MiCam Ultima CMOS camera (SciMedia USA Ltd) with a spatial resolution of 1 x 1 mm. Optical data were filtered and activation and repolarization properties were analyzed using BraviAna software (Brainvision). Arrhythmias were quantified and analyzed for dominant frequency and regularity.

Histological studies

Immediately after RV dissection, transmural blocks (1.5 x 1.5 cm) of myocardium were taken from the apex of the RV and fixed in 4% paraformaldehyde at 4°C (Sham, rTOF N=4). After dehydration in ethanol, samples were embedded in paraffin, sectioned and stained with Masson's Trichrome. Images were obtained at a 10X magnification on a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a CCD camera. Collagen quantification was performed blindly by color thresholding using ImageJ software (NIH) and expressed as a percentage of total section area.

Western blot

Proteins (50 µg) were separated on 12% acrylamide gels (TGX Stain-Free precast gels, Bio-Rad); under reducing conditions followed by semi-dry transfer (Trans-blot Turbo, Bio-Rad). PVDF membranes were probed with primary antibodies overnight followed by secondary antibodies for 2h. Following total hybridized protein imaging under UV light, signals were revealed by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific). Signal quantification was performed using ImageJ (NIH) and specific band intensity was normalized to the total protein intensity of each lane.

Data analysis

Data are expressed as means ± SD. Statistical analysis was performed using SigmaStat software. Statistical differences between groups were tested using unpaired or paired Student tests or their non-parametric equivalent and linear regression as appropriate. Statistically significant difference was assumed for $P < 0.05$.

Results

Animal model

A significant increase in heart weight and RV weight normalized to BSA were found in rTOF pigs, highlighting the presence of a RV hypertrophy in these animals (Table 1). Pulmonary artery flow analysis at the level of the valve revealed the presence of a diastolic retrograde flow in all rTOF pigs which was absent in Sham pigs. The degree of regurgitation, quantified as a percentage of stroke volume was significantly higher in rTOF animals. RV hypertrophy, dilatation and leftward septal bulging could be identified on in vivo CMR images of rTOF pigs (see Supplemental Figure 1). In these animals, RV dilatation was reflected by an increase in both end-systolic and end-diastolic RV volumes normalized to BSA (Table 1). RV stroke volume normalized to BSA remained unchanged but RV ejection fraction was significantly reduced in rTOF pigs versus Shams indicating RV dysfunction.

Action potential duration heterogeneity in rTOF right ventricles

Mean APD80 across the whole epi- and endocardial surface was the same between both groups (Figure 1A). However, an elevated APD80 heterogeneity was identified in rTOF preparations. Quantitative analysis of APD80 distribution across the entire RV revealed an increased dispersion of APD80 in the rTOF epicardium, but not the endocardium, compared to Sham (Figure 1B).

This increased heterogeneity in the RV epicardium was associated with a differential remodeling in the anterior and posterior RV (Figure 2A). At 1Hz, rTOF APD20 and APD80 were prolonged in the anterior RV epicardium resulting in a significant difference with Sham anterior but also with rTOF posterior epicardial APD80 (Figure 2B, C). In contrast to the epicardium, the anterior APD20 was shorter in rTOF than Sham RV endocardium with no significant difference at the APD80 level (Figure 2D, E). For both Sham and rTOF RVs, APD20 and APD80 were shorter in the anterior than in the posterior endocardium. At increased pacing frequencies (i.e. up to 5Hz), Sham and rTOF APD20 and APD80 restitution properties were similar in all RV regions (Supplemental Figure 2), although increasing stimulation frequency revealed significantly shorter APD20s in the posterior epicardium of rTOF RVs compared to Sham. Interestingly, KCND3 (Kv4.3) expression was inversely regulated in the epi- and endocardium of rTOF RVs such that it was reduced in the epicardium but increased in the endocardium compared to Sham (Supplemental Figure 3). This observation was further confirmed at the protein level (Supplemental Figure 4). In addition, KCNE2 (MiRP1) mRNA expression was significantly greater in rTOF epi- and endocardium than Sham (Supplemental Figure 3).

Action potential duration gradients in rTOF right ventricles

In the epicardium and endocardium of Sham animals, longer APD80s in the posterior than in the anterior RV resulted in a positive RV posterior to anterior APD80 difference (APD80_{POST-ANT} gradient). This gradient was reversed and significantly different from Sham on the epicardial surface of rTOF RVs (Figure 3A). In the RV endocardium of rTOF pigs, APD80_{POST-ANT} gradient remained positive and similar to Sham but significantly different from the rTOF epicardium. The APD80_{POST-ANT} epicardial gradient was significantly different from Sham at low pacing frequencies (1 – 2 Hz). When stimulation frequency was increased above 2 Hz, APD80_{POST-ANT} gradients decreased in all Sham and rTOF RV regions leading to similar gradient values between the different groups (Figure 3B). Similarly, the epicardial antero-posterior gradient was reversed at the APD20 level in rTOF RVs compared to Sham and significantly different to the endocardial gradient (Supplemental Figure 5).

The transmural APD80 gradient (APD80_{ENDO-EPI}) was also reversed in the anterior rTOF RV as a consequence of epicardial APD80 prolongation in this region. Thus, rTOF anterior RV APD80_{ENDO-EPI} gradient was significantly different from Sham anterior and from rTOF posterior gradients (Figure 3C). APD80_{ENDO-EPI} gradient decreased rapidly as stimulation frequency was increased in Sham anterior RV leading to similar gradient values between the Sham and rTOF animals (Figure 3D). Similarly, the opposite transmural regulation of APD20 in the anterior rTOF RV resulted in a reversed

APD20_{ENDO-EPI} gradient which was significantly different to the posterior transmural gradient (Supplemental Figure 5).

Right ventricular activation and conduction velocity

Epicardial and endocardial RV activation maps revealed a disorganized activation in rTOF preparations with multiple regions of conduction slowing located in both anterior and posterior regions (Figure 4A). Total activation time of the RV was prolonged in rTOF epicardium and endocardium compared to Sham (Figure 4B). Masson's Trichrome staining showed increased collagen deposition and some degree of muscle fiber disarray in RV apical sections from rTOF hearts (Figure 5A). Collagen content quantification confirmed the presence of a significant increase in interstitial collagen in rTOF RV sections compared to Sham (Figure 5B). A positive linear correlation was found between the endocardial activation time and both the collagen content (Figure 5C) and the RV end-diastolic volume (Figure 5D). Additionally, our transcriptomic approach revealed the presence of a significant remodeling of the extracellular matrix (ECM) in the anterior rTOF endocardium. The expression of several genes coding for proteins forming or involved in the regulation of the ECM was modified in the rTOF endocardium compared to Sham (Supplemental Table 1). Interestingly, the regulation of 18 of these 22 genes is commonly associated with ECM proliferation.

Moreover, a significant decrease in longitudinal and transverse conduction velocities was found in rTOF RV epicardium (Figure 6A) and endocardium (Figure 6B). RV conduction velocities decreased with rate in both experimental groups such that the difference was preserved over a range of stimulation frequencies in the epicardium and the endocardium (Supplemental Figure 6). Although Connexin-43 mRNA expression was not significantly altered in the anterior rTOF RV, its protein level was lower in the rTOF RV epicardium than in Sham (Figure 6 A) but remained unchanged in the endocardium (Figure 6B).

Arrhythmias

Spontaneous arrhythmias (often developing secondary to an increase in pacing frequency during our restitution protocol) were more frequently observed in rTOF perfused isolated RVs than in Sham (Figure 7A). Interestingly, there was a negative linear correlation between the number of arrhythmic events and the transverse conduction velocity measured at 1 Hz on the endocardium of rTOF preparations (Figure 7B). Most rTOF arrhythmias (14/16) were sustained VT episodes with the exception of 2 ventricular fibrillation episodes. VT dominant frequency was similar in the anterior and posterior RV regions (Anterior 3.31 ± 1.54 Hz; Posterior 3.89 ± 1.34 Hz) but was lower than in the 2 arrhythmic episodes observed in Sham preparations (Anterior 9.77 ± 1.38 Hz; Posterior 11.12 ± 0.54 Hz). However, VT regularity was heterogeneous across rTOF RVs (Figure 7C), with a lower regularity in the anterior than in the posterior region (Figure 7D).

Discussion

We found a significant remodeling of RV properties which generates a pro-arrhythmic substrate in an animal model of repaired TOF. Previous work investigating arrhythmia mechanisms in this pathological condition were based on electrocardiographic and endocardial mapping and could not fully address this question. To the best of our knowledge, this is the first report of a significant remodeling of the ECM and the electrophysiological properties across the whole RV in the context of post-operative TOF. This RV remodeling involved (i) a concomitant increase in epicardial and decrease in endocardial APD20 which was mirrored by Kv4.3 expression pattern (ii) an increase in epicardial APD80 and heterogeneity together with an alteration of the physiological APD gradients (iii) a prolonged activation time due to slower conduction velocities and localized regions of slow conduction well beyond the scar regions which may be related to lower Connexin-43 expression and a proliferation of the ECM with an increase in myocardial collagen deposition. In conjunction with RV

scars, this substrate appears to be correlated to the occurrence of spontaneous arrhythmias *ex vivo* and may thus contribute to the higher risk for SCD in patients with surgically-corrected TOF.

Slow and discontinuous RV activation in repaired tetralogy of Fallot

QRS prolongation has become a hallmark in patients with repaired TOF with a duration exceeding 180 ms considered a predictor of severe ventricular arrhythmias which was linked to RV dilatation (Berul et al., 1997; Gatzoulis et al., 1995). The QRS interval is a global index of cardiac activation and RV mechanisms associated with QRS prolongation in corrected patients remain unclear.

We have previously identified this QRS feature in our animal model (Thambo et al., 2010; Thambo et al., 2012). In the present study, we find significant conduction disturbances in the RV associated with the RV end-diastolic volume. Our results suggest that longer RV activation time was related to the presence of multiple regions of conduction slowing throughout the RV. Interestingly, this observation is reminiscent of the fractionated electrograms observed all over the RV in an endocardial mapping study in TOF-corrected patients (Deanfield et al., 1984) and may be due to diffuse fibrosis throughout the RV as seen in advanced-stage dilated cardiomyopathy (Assomull et al., 2006). In patients with repaired TOF, CMR-based imaging techniques have allowed the localization of fibrosis within and beyond the scar region (Broberg et al., 2010; Wald et al., 2009) and higher degrees of fibrosis were associated with the occurrence of arrhythmias (Babu-Narayan et al., 2006). In this study, we also showed a remodeling in the expression of genes coding for proteins which are constitutive (e.g. Keratin 18, Cartilage intermediate layer protein) or regulate the ECM (e.g. Fibroblast growth factor 9). The net effect of this regulation is expected to favor ECM proliferation (for 18 out of 22 genes), and is likely to contribute to conduction slowing. Surprisingly, our transcriptomic approach did not unveil any significant alteration in the expression of the major cardiac collagen or metalloproteinase (MMP) subtypes. Instead, we found an upregulation of collagen type VIII and a downregulation of MMP type 11 which may represent a remodeling specific to combined pressure and volume RV overload. This analysis also brought to light potential new markers of ECM remodeling in the overloaded RV such as serpin-family proteins (Nexin-1, Serpine1) known to be critical players in ECM regulation in several organs (Ghosh and Vaughan, 2012), or Galectin-1 (LGALS1), a β -galactoside binding lectin from the same family as Galectin-3, a well-described pro-fibrotic protein shown to be upregulated in hypertrophy and heart failure (de Boer et al., 2009). Interestingly, the expression of several proteins known to be regulated by mechanical stress such as Brain Natriuretic peptide (BNP) (Yoshimura et al., 1993), Tenascin-C (TNC) (Yamamoto et al., 1999), Mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1) (Lal et al., 2007) was altered in rTOF pigs, further highlighting the role of RV dilatation in ECM regulation. ECM regulation in the RV of rTOF pigs contributes to a global gene expression remodeling described in a recent study (Charron et al., 2015). Moreover, the slower conduction velocities we observed in the rTOF RV epicardium are likely related to the decrease in epicardial Connexin-43 expression. A similar decrease in Connexin-43 expression was found in RV biopsies from patients with tetralogy of Fallot (Kolcz et al., 2005) and in human failing hearts in which it was associated with reduced conduction velocity (Glukhov et al., 2012). In the context of repaired TOF, RV dilatation and renin-angiotensin system activation may contribute to Connexin-43 downregulation as demonstrated in the acutely stretched RV of anesthetized dogs (Hussain et al., 2010).

Heterogeneous RV repolarization in repaired tetralogy of Fallot

Available information regarding RV repolarization in repaired TOF are limited and controversial. Electrocardiographic studies have shown a prolongation (Sarubbi et al., 1999), a shortening (Helbing et al., 2002) or no change (Berul et al., 1997) in QTc or JTc duration in these patients. These variations are likely to originate from differences in surgical approach but also in patient's age at surgery and follow-up which have been suggested as arrhythmic risk factors (Walsh, 2014). Variable degrees of RV overload due to differences in age and surgical procedure could explain the different QT/JT duration between patient cohorts. In the present study, we found a heterogeneous APD remodeling with a significant APD prolongation in the anterior RV epicardium of rTOF pigs. There was

a trend for a reduction in KCNH2 (Kv11.1) mRNA expression in the anterior RV epicardium of rTOF compared to Sham pigs and a significant upregulation of KCNE2 (MiRP1), a β -subunit which has been shown to repress the ion currents mediated by Kv11.1 (IKr) and Kv7.1 (IKs) (Abbott et al., 1999; Wu et al., 2006) which could contribute to the APD prolongation in the anterior RV epicardium. The distinct embryological origin and electrophysiology (Boukens et al., 2013) and the proximity of the infundibular scar may predispose the anterior RV to this remodeling. A similar RV remodeling with longer APDs in the anterior epicardium was found in an animal model of RV hypertension (Benoist et al., 2014) which showed high arrhythmia susceptibility (Benoist et al., 2011). However, in this animal model APD was globally increased in the RV, whereas in our study mean RV APD was unchanged. It is possible to speculate that the trend for shorter APD observed in the posterior RV of our animal model may be due to chronic RV volume overload as seen in an acute study (Greve et al., 2001) while a pressure-overload specific remodeling of the anterior RV may lead to APD prolongation in this region.

An opposite transmural remodeling of the APD20 was found in rTOF anterior RVs which was mirrored by Kv4.3 mRNA and protein expression suggesting a transcriptional regulation of this protein. This remodeling resembles that described in the failing human left ventricle where the transient outward Ca^{2+} -insensitive current (I_{to1}), which is mainly carried by Kv4.3, was shown to be reduced in epicardial myocytes while unchanged in the endocardium (Nabauer et al., 1996). In addition to modulating APD20, regulation of this current may also alter late APD repolarization as seen in human and rabbit atrial myocytes (Workman et al., 2012). In the pig left ventricle, the presence of I_{to1} and the expression of Kv4.3 was questioned by some (Li et al., 2003) but not all (Lacroix et al., 2002). Here we show for the first time the presence of Kv4.3 in the pig RV at the mRNA and protein level and our results suggest that I_{to1} plays a role in the regulation of early APD repolarization in this species.

Dispersion of APD leads to dispersion of refractoriness and is known to predispose to reentry (Coronel et al., 2013; Kuo et al., 1983). Dispersion of repolarization has commonly been described on ECGs of patients with repaired TOF (Gatzoulis et al., 1997; Helbing et al., 2002). In rTOF pigs, we show a significant increase in epicardial APD dispersion which was in part related to the epicardial APD prolongation in the anterior RV. Moreover, this remodeling led to a significant decrease in the transmural APD gradient at early and late repolarization levels in the anterior region but not the posterior region in rTOF preparations. A reduced transmural APD gradient has been described in human left-sided heart failure and was related to a larger increase in APD in the epicardium than in the endocardium (Glukhov et al., 2010) as observed in the anterior RV of rTOF animals. Another consequence of the regional variations in APD in rTOF RVs is a decrease and reversal of the antero-posterior APD gradient at early and late repolarization levels in the epicardium but not in the endocardium. Regionalization of the transmural and antero-posterior APD gradient alterations enhances APD dispersion in rTOF RVs and is therefore likely to further increase the risk of reentry.

However, in patients with corrected TOF, no correlation was found between RV volume and QTc or JTc dispersion (Helbing et al., 2002) and in rTOF pigs, RV APD did not correlate significantly with RV volume or the number of arrhythmic events. This suggests that RV dispersion of repolarization may not be directly related to dilatation in repaired TOF patients and is not a major contributor to arrhythmia initiation in this context although its contribution to arrhythmia maintenance and precipitation to fibrillation cannot be ruled out.

Arrhythmias

Spontaneous arrhythmias occurring during the restitution pacing protocol were more frequent in rTOF than Sham RVs and the number of arrhythmia per preparation correlated with transverse endocardial conduction velocity. This finding further highlights the link between prolonged RV activation and arrhythmia reported in patients (Gatzoulis et al., 2000a; Gatzoulis et al., 1995). Moreover, the correlation between RV activation time and end-diastolic volume indirectly links RV dilatation to an increased arrhythmic risk. Interestingly, Zeltser and colleagues isolated the different lesions of a similar swine model and showed that sustained arrhythmias could only be induced in

23% of pigs with a RVOT scar versus 83% in pigs with pulmonary insufficiency and RVOT scar (Zeltser et al., 2005). This illustrates the pro-arrhythmic synergy of RV overload and surgical scarring in this context.

Most of the arrhythmic episodes observed in isolated rTOF ventricles were sustained tachycardia (14/16) that required cardioversion. The lower VT dominant frequency observed in rTOF hearts compared to Sham episodes may be related to the slower, discontinuous activation and heterogeneous repolarization of the rTOF RV. Despite their lower dominant frequency, rTOF VT episodes displayed a heterogeneous regularity index distribution with less regularity in the anterior RV which appeared to be the most remodeled RV region.

Clinical implications

The characterization of the RV electrophysiological remodeling in surgically-corrected TOF has direct clinical implications as it could help identify patients at risk of complex arrhythmias and SCD and may suggest therapeutic interventions such as pulmonary valve replacement, radiofrequency ablation, or cardiac resynchronization. Moreover, antiarrhythmic therapy aimed at this remodeling may prevent SCD or improve radiofrequency ablation success.

According to the results from the present study and others (Babu-Narayan et al., 2006; Wald et al., 2009), therapeutically targeting fibrosis to reduce the arrhythmic risk and improve RV function in patients with repaired TOF appears interesting. The renin-angiotensin system is activated in these patients (Mainwaring et al., 1996) and is likely to promote myocardial fibrosis. Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition has proven disappointing in a clinical trial (Babu-Narayan et al., 2012). The study was limited by the small number of patients and the short duration of the protocol and other anti-fibrotic drugs such as T galectin-3 inhibitors (Yu et al., 2013) should not be disregarded. Furthermore, since fibrosis is likely triggered by chronic volume overload and stretch (Hutchinson et al., 2010), early surgical interventions aiming at correcting pulmonary regurgitation prior to significant RV remodeling could be another potential therapeutic approach.

Limitations

Our animal model aimed at reproducing post-operative Fallot hemodynamics and electrophysiology in healthy pigs in the absence of TOF. However, factors independent of surgery (e.g. genetic substrate (Michielon et al., 2006), hypoxemia (Chowdhury et al., 2006)) may play a role in the ventricular remodeling and arrhythmia generation.

We did not apply specific pacing protocols to investigate the vulnerability to ventricular arrhythmias due to experimental time constraints on the *ex vivo* tissue preparations. However, the occurrence of spontaneous arrhythmias arising during the restitution protocol by gradually increasing the pacing frequency from a single stimulation location indicates a strong arrhythmogenic substrate in the rTOF animals.

Conclusion

We found a significant remodeling of RV conduction and repolarization properties in a porcine model reproducing TOF repair lesions. In the volume- and pressure-overloaded RV, ECM proliferation and Connexin-43 downregulation conspire to slow electrical propagation while APD heterogeneity appeared to involve a specific remodeling in Kv4.3 and MiRP1 expression in the anterior RV. This remodeling is likely to contribute to the arrhythmogenic substrate, arrhythmia complexity and SCD in corrected TOF patients.

Funding

This work was funded by the Agence Nationale de la Recherche through the grant ANR-10-IAHU04-LIRYC and through the EU FP7 IRSES program CORDIS3D (IRSES-GA-2013-317767). D.B. was funded by

a Fondation Recherche Médicale fellowship and S.H.G. was funded by a European Union Marie Curie fellowship.

Conflict of Interest

None declared

References

1. Egbe A, Uppu S, Lee S, Ho D, Srivastava S. Changing prevalence of severe congenital heart disease: a population-based study. *Pediatr Cardiol* 2014;**35**:1232-1238.
2. Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller JH, Gillette PC, Webb GD, Redington AN. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *The Lancet* 2000;**356**:975-981.
3. Downar E, Harris L, Kimber S, Mickleborough L, Williams W, Sevapsidis E, Masse S, Chen TC, Chan A, Genga A, et al. Ventricular tachycardia after surgical repair of tetralogy of Fallot: results of intraoperative mapping studies. *J Am Coll Cardiol* 1992;**20**:648-655.
4. Zeppenfeld K, Schalij MJ, Bartelings MM, Tedrow UB, Koplan BA, Soejima K, Stevenson WG. Catheter ablation of ventricular tachycardia after repair of congenital heart disease: electroanatomic identification of the critical right ventricular isthmus. *Circulation* 2007;**116**:2241-2252.
5. Khairy P, Stevenson WG. Catheter ablation in tetralogy of Fallot. *Heart Rhythm* 2009;**6**:1069-1074.
6. Morwood JG, Triedman JK, Berul CI, Khairy P, Alexander ME, Cecchin F, Walsh EP. Radiofrequency catheter ablation of ventricular tachycardia in children and young adults with congenital heart disease. *Heart Rhythm* 2004;**1**:301-308.
7. Kapel GF, Reichlin T, Wijnmaalen AP, Piers SR, Holman ER, Tedrow UB, Schalij MJ, Stevenson WG, Zeppenfeld K. Re-entry using anatomically determined isthmuses: a curable ventricular tachycardia in repaired congenital heart disease. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2015;**8**:102-109.
8. Helbing WA, Roest AA, Niezen RA, Vliegen HW, Hazekamp MG, Ottenkamp J, de Roos A, van der Wall EE. ECG predictors of ventricular arrhythmias and biventricular size and wall mass in tetralogy of Fallot with pulmonary regurgitation. *Heart* 2002;**88**:515-519.
9. Marie PY, Marcon F, Brunotte F, Briancon S, Danchin N, Worms AM, Robert J, Pernot C. Right ventricular overload and induced sustained ventricular tachycardia in operatively "repaired" tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1992;**69**:785-789.
10. Gatzoulis MA, Till JA, Somerville J, Redington AN. Mechanoelectrical interaction in tetralogy of Fallot. QRS prolongation relates to right ventricular size and predicts malignant ventricular arrhythmias and sudden death. *Circulation* 1995;**92**:231-237.
11. Therrien J, Siu SC, Harris L, Dore A, Niwa K, Janousek J, Williams WG, Webb G, Gatzoulis MA. Impact of pulmonary valve replacement on arrhythmia propensity late after repair of tetralogy of Fallot. *Circulation* 2001;**103**:2489-2494.
12. Gatzoulis MA, Till JA, Redington AN. Depolarization-repolarization inhomogeneity after repair of tetralogy of Fallot. The substrate for malignant ventricular tachycardia? *Circulation* 1997;**95**:401-404.
13. Coronel R, Wilders R, Verkerk AO, Wiegerinck RF, Benoist D, Bernus O. Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2013;**1832**:2432-2441.
14. Thambo JB, Roubertie F, De Guillebon M, Labrousse L, Iriart X, Ntsinjana H, Lafitte S, Ploux S, Haissaguerre M, Roques X, Dos Santos P, Bordachar P. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2012;**154**:38-42.
15. Bogaert J. Cardiac Function. In: Bogaert J, Dymarkowski S, Taylor AM, Muthurangu V, eds. *Clinical Cardiac MRI*, Springer ed: Springer, 2012:109-165.
16. Berul CI, Hill SL, Geggel RL, Hijazi ZM, Marx GR, Rhodes J, Walsh KA, Fulton DR. Electrocardiographic markers of late sudden death risk in postoperative tetralogy of Fallot children. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1997;**8**:1349-1356.

17. Thambo J-B, Dos Santos P, De Guillebon M, Roubertie F, Labrousse L, Sacher F, Iriart X, Lafitte S, Ploux S, Jais P, Roques X, Haissaguerre M, Ritter P, Clementy J, Narayan SM, Bordachar P. Biventricular stimulation improves right and left ventricular function after tetralogy of Fallot repair: Acute animal and clinical studies. *Heart Rhythm* 2010;**7**:344-350.
18. Deanfield JE, McKenna WJ, Presbitero P, England D, Graham GR, Hallidie-Smith K. Ventricular arrhythmia in unrepaired and repaired tetralogy of Fallot. Relation to age, timing of repair, and haemodynamic status. *Br Heart J* 1984;**52**:77-81.
19. Assomull RG, Prasad SK, Lyne J, Smith G, Burman ED, Khan M, Sheppard MN, Poole-Wilson PA, Pennell DJ. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;**48**:1977-1985.
20. Broberg CS, Chugh SS, Conklin C, Sahn DJ, Jerosch-Herold M. Quantification of diffuse myocardial fibrosis and its association with myocardial dysfunction in congenital heart disease. *Circ Cardiovasc Imaging* 2010;**3**:727-734.
21. Wald RM, Haber I, Wald R, Valente AM, Powell AJ, Geva T. Effects of regional dysfunction and late gadolinium enhancement on global right ventricular function and exercise capacity in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Circulation* 2009;**119**:1370-1377.
22. Babu-Narayan SV, Kilner PJ, Li W, Moon JC, Goktekin O, Davlouros PA, Khan M, Ho SY, Pennell DJ, Gatzoulis MA. Ventricular fibrosis suggested by cardiovascular magnetic resonance in adults with repaired tetralogy of fallot and its relationship to adverse markers of clinical outcome. *Circulation* 2006;**113**:405-413.
23. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis. *J Cell Physiol* 2012;**227**:493-507.
24. de Boer RA, Voors AA, Muntendam P, van Gilst WH, van Veldhuisen DJ. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *Eur J Heart Fail* 2009;**11**:811-817.
25. Yoshimura M, Yasue H, Okumura K, Ogawa H, Jougasaki M, Mukoyama M, Nakao K, Imura H. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation* 1993;**87**:464-469.
26. Yamamoto K, Dang QN, Kennedy SP, Osathanondh R, Kelly RA, Lee RT. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *J Biol Chem* 1999;**274**:21840-21846.
27. Lal H, Verma SK, Smith M, Guleria RS, Lu G, Foster DM, Dostal DE. Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential regulation through beta1-integrin and focal adhesion kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2007;**43**:137-147.
28. Charron S, Roubertie F, Benoist D, Dubes V, Gilbert SH, Constantin M, Vieillot D, Elbes D, Quesson B, Bordachar P, Haissaguerre M, Bernus O, Thambo J-B, Rooryck C. Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot. *PLoS ONE* 2015;**10**:e0134146.
29. Kolcz J, Drukala J, Bzowska M, Rajwa B, Korohoda W, Malec E. The expression of connexin 43 in children with Tetralogy of Fallot. *Cell Mol Biol Lett* 2005;**10**:287-303.
30. Glukhov AV, Fedorov VV, Kalish PW, Ravikumar VK, Lou Q, Janks D, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Conduction remodeling in human end-stage nonischemic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation* 2012;**125**:1835-1847.
31. Hussain W, Patel PM, Chowdhury RA, Cabo C, Ciaccio EJ, Lab MJ, Duffy HS, Wit AL, Peters NS. The Renin-Angiotensin system mediates the effects of stretch on conduction velocity, connexin43 expression, and redistribution in intact ventricle. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2010;**21**:1276-1283.
32. Sarubbi B, Pacileo G, Ducceschi V, Russo MG, Iacono C, Pisacane C, Iacono A, Calabro R. Arrhythmogenic substrate in young patients with repaired tetralogy of Fallot: role of an abnormal ventricular repolarization. *Int J Cardiol* 1999;**72**:73-82.
33. Walsh EP. Sudden death in adult congenital heart disease: risk stratification in 2014. *Heart Rhythm* 2014;**11**:1735-1742.

34. Abbott GW, Sesti F, Splawski I, Buck ME, Lehmann MH, Timothy KW, Keating MT, Goldstein SA. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* 1999;**97**:175-187.
35. Wu DM, Jiang M, Zhang M, Liu XS, Korolkova YV, Tseng GN. KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm* 2006;**3**:1469-1480.
36. Boukens BJ, Sylva M, de Gier-de Vries C, Remme CA, Bezzina CR, Christoffels VM, Coronel R. Reduced sodium channel function unmasks residual embryonic slow conduction in the adult right ventricular outflow tract. *Circ Res* 2013;**113**:137-141.
37. Benoist D, Stones R, Benson AP, Fowler ED, Drinkhill MJ, Hardy ME, Saint DA, Cazorla O, Bernus O, White E. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Prog Biophys Mol Biol* 2014;**115**:162-172.
38. Benoist D, Stones R, Drinkhill M, Bernus O, White E. Arrhythmogenic substrate in hearts of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**300**:H2230-2237.
39. Greve G, Lab MJ, Chen R, Barron D, White PA, Redington AN, Penny DJ. Right ventricular distension alters monophasic action potential duration during pulmonary arterial occlusion in anaesthetised lambs: evidence for arrhythmogenic right ventricular mechanoelectrical feedback. *Exp Physiol* 2001;**86**:651-657.
40. Nabauer M, Beuckelmann DJ, Uberfuhr P, Steinbeck G. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation* 1996;**93**:168-177.
41. Workman AJ, Marshall GE, Rankin AC, Smith GL, Dempster J. Transient outward K⁺ current reduction prolongs action potentials and promotes afterdepolarisations: a dynamic-clamp study in human and rabbit cardiac atrial myocytes. *J Physiol* 2012;**590**:4289-4305.
42. Li GR, Du XL, Siow YL, O K, Tse HF, Lau CP. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovasc Res* 2003;**58**:89-98.
43. Lacroix D, Gluais P, Marquie C, D'Hoinne C, Adamantidis M, Bastide M. Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 2002;**54**:42-50.
44. Kuo CS, Munakata K, Reddy CP, Surawicz B. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation* 1983;**67**:1356-1367.
45. Glukhov AV, Fedorov VV, Lou Q, Ravikumar VK, Kalish PW, Schuessler RB, Moazami N, Efimov IR. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circ Res* 2010;**106**:981-991.
46. Zeltser I, Gaynor JW, Petko M, Myung RJ, Birbach M, Waibel R, Ittenbach RF, Tanel RE, Vetter VL, Rhodes LA. The roles of chronic pressure and volume overload states in induction of arrhythmias: an animal model of physiologic sequelae after repair of tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;**130**:1542-1548.
47. Mainwaring RD, Lamberti JJ, Moore JW, Billman GF, Carter TL, Nelson JC. Tetralogy of Fallot repair results in activation of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Eur Heart J* 1996;**17**:1421-1425.
48. Babu-Narayan SV, Uebing A, Davlouros PA, Kemp M, Davidson S, Dimopoulos K, Bayne S, Pennell DJ, Gibson DG, Flather M, Kilner PJ, Li W, Gatzoulis MA. Randomised trial of ramipril in repaired tetralogy of Fallot and pulmonary regurgitation: the APPROPRIATE study (Ace inhibitors for Potential PREvention Of the deleterious effects of Pulmonary Regurgitation In Adults with repaired TEtralogy of Fallot). *Int J Cardiol* 2012;**154**:299-305.
49. Yu L, Ruifrok WP, Meissner M, Bos EM, van Goor H, Sanjabi B, van der Harst P, Pitt B, Goldstein IJ, Koerts JA, van Veldhuisen DJ, Bank RA, van Gilst WH, Sillje HH, de Boer RA.

- Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circ Heart Fail* 2013;**6**:107-117.
50. Hutchinson KR, Stewart JA, Jr., Lucchesi PA. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 2010;**48**:564-569.
 51. Michielon G, Marino B, Formigari R, Gargiulo G, Picchio F, Digilio MC, Anaclerio S, Oricchio G, Sanders SP, Di Donato RM. Genetic syndromes and outcome after surgical correction of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 2006;**81**:968-975.
 52. Chowdhury UK, Sathia S, Ray R, Singh R, Pradeep KK, Venugopal P. Histopathology of the right ventricular outflow tract and its relationship to clinical outcomes and arrhythmias in patients with tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;**132**:270-277.

Table Legends

Table 1 – Animal weights and cardiac magnetic resonance characterization. Data were obtained 23 $\pm$ 1 weeks post-surgery. Values are means $\pm$ SD. Animal numbers for Sham-operated (Sham) and repaired tetralogy of Fallot (rTOF) groups are indicated in each column. Statistical difference between Sham and rTOF is indicated for each parameter. BSA: body surface area; PRF: pulmonary regurgitation fraction; RV-ESVi: right ventricular end-systolic volume indexed to BSA; RV-EDVi: right ventricular end-diastolic volume indexed to BSA; RV-SVi: right ventricular stroke volume indexed to BSA; RVEF: right ventricular ejection fraction.

Figure Legends

Figure 1 – Mean right ventricular action potential duration and dispersion from epicardial and endocardial surfaces. (A) Mean action potential duration at 80% repolarization (APD80) measured over the whole epicardial and endocardial surface while paced at 1 Hz were similar in Sham (black) and rTOF (grey) RVs. (B) APD80 dispersion in the epicardium and endocardium of Sham and rTOF RVs paced at 1 Hz. APD80 dispersion was increased in rTOF epicardium. Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, Sham N=4, rTOF N=5-6.

Figure 2 – Regional action potential duration in Sham and rTOF right ventricles. (A) Representative optical action potential traces from the RV anterior and posterior epicardium (EPI) and endocardium (ENDO) from Sham (black) and rTOF (grey) pigs. Epicardial APD20 (B) and APD80 (C) were prolonged in the anterior RV of rTOF pigs compared to Sham. (D), Endocardial APD20 was shorter in the anterior rTOF RV than in Sham and posterior rTOF RV. (E) APD80 from Sham and rTOF RVs were not different at 1 Hz pacing frequency. Shorter APD80 was observed in the anterior region than in the posterior for both groups. Data are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=5-6.

Figure 3 – Action potential duration gradients in the right ventricle of Sham and rTOF pigs. (A) RV antero-posterior APD80 gradient ($APD80_{POST-ANT}$, see methods for calculation) was reversed in rTOF (grey) epicardium and significantly different from Sham (black) epicardial and rTOF endocardial gradients at 1 Hz pacing frequency. (B) RV Antero-posterior APD80 gradient at different basic cycle lengths (BCL) from Sham (black) epicardium (solid line), endocardium (dashed line); and rTOF (grey) epicardium (solid line) and endocardium (dashed line). (C) RV transmural APD80 gradient ($APD80_{ENDO-EPI}$, see methods for calculation) was reversed and significantly different from Sham in the anterior region while remaining unchanged in rTOF posterior region upon pacing at 1 Hz. (D) RV transmural APD80 gradient at different BCL from Sham anterior, posterior RV; and rTOF anterior and posterior RV. Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=5-6.

Figure 4 – Right ventricular activation in Sham and rTOF preparations. (A) Representative epicardial and endocardial activation maps from Sham and rTOF RVs with 5 ms-spaced isochrones. Multiple areas of slowed conduction were typically observed (yellow arrows) throughout rTOF RVs. (B) Epicardial and endocardial activation times measured at 1 Hz pacing frequency were prolonged in rTOF (grey) RVs compared to Sham (black). Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=5-6.

Figure 5 – Collagen content in Sham and rTOF right ventricles. (A) Example images from histological sections of Sham and rTOF RVs stained with Masson's Trichrome. Note the greater collagen staining (blue) and the disorganized myocardial structure in rTOF section. (B) Collagen content, quantified as a percentage of total section area was increased in rTOF RVs compared to Sham. RV endocardial activation time correlated linearly with RV end-diastolic volume indexed to body surface area (RV-EDVi) (C) and collagen content (D). Data are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=4-6.

Figure 6 – Conduction velocities and Connexin-43 expression in Sham and rTOF right ventricles. Epicardial (A) and endocardial (B) conduction velocities (CV_{EPI} ; CV_{ENDO}) measured in the RV mid-free wall while pacing at 1Hz were reduced in the longitudinal (fast) and transverse (slow) directions of propagation in rTOF (grey) compared to Sham (black) preparations. Connexin-43 expression was

decrease in the anterior RV epicardium of rTOF pigs (**C**) but not in the endocardium (**D**) compared to Sham. Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Sham N=3-4, rTOF N=3-6.

Figure 7 – Quantification and regularity of right ventricular arrhythmias. (**A**) The mean number of spontaneous ex vivo arrhythmias observed following an increase in stimulation frequency in a perfused RV was significantly increased in rTOF preparations. (**B**) The total number of arrhythmic events per preparation correlated with endocardial transverse conduction velocity (CV-Transverse_{ENDO}). (**C**) Example of a regularity index map from a rTOF RV during an episode of ventricular tachycardia (VT). Note the heterogeneity in arrhythmia regularity across the RV. (**D**) Mean arrhythmia regularity index was lower in RV anterior than in RV posterior region in rTOF preparations (n=14 VT events). Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=6.

	Sham	rTOF	p-value
	N=4	N=6	
Animal weights			
Body weight(kg)	48 ± 6	61 ± 11	0.05
BSA (m ²)	0.93 ± 0.07	1.05 ± 0.05	0.02
Heart weight/BSA(g/m ²)	202 ± 14	283 ± 21	0.01
RV weight/BSA (g/m ²)	78 ± 4	133 ± 16	0.02
CMR characterization			
Heart rate (beats/min)	117 ± 15	98 ± 12	0.09
PRF (%)	0	9 ± 7	0.03
RV-ESVi (ml/m ²)	37 ± 6	122 ± 19	< 0.001
RV-EDVi (ml/m ²)	75 ± 5	179 ± 42	0.002
RV-SVi (ml/m ²)	39 ± 10	57 ± 24	0.14
RVEF (%)	51 ± 11	31 ± 6	0.03

Table 1

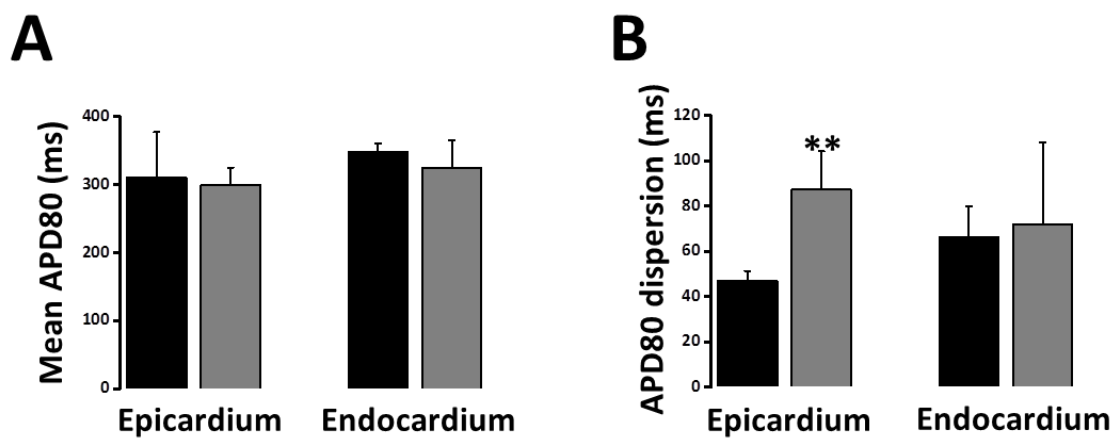


Figure 1

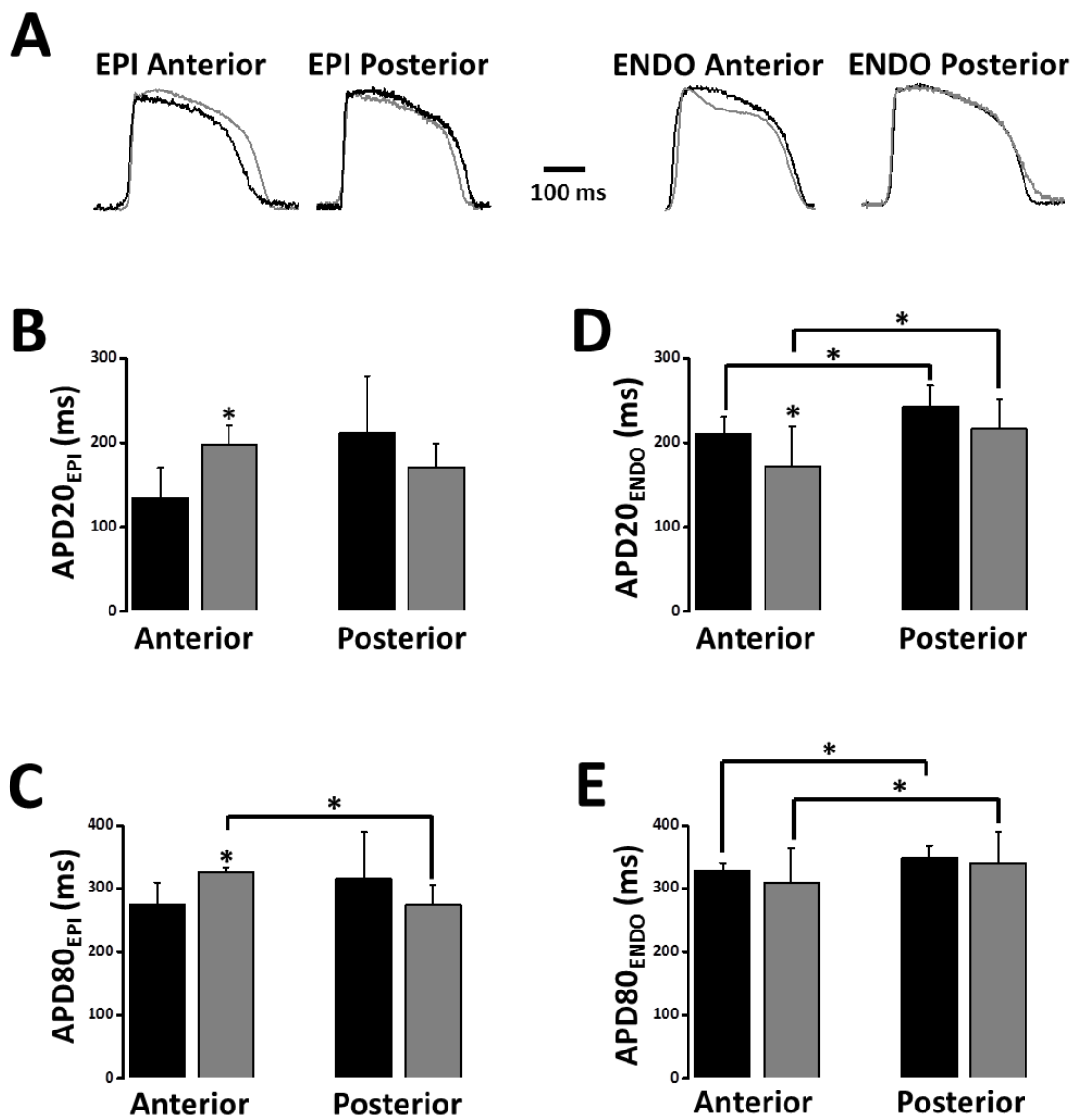


Figure 2

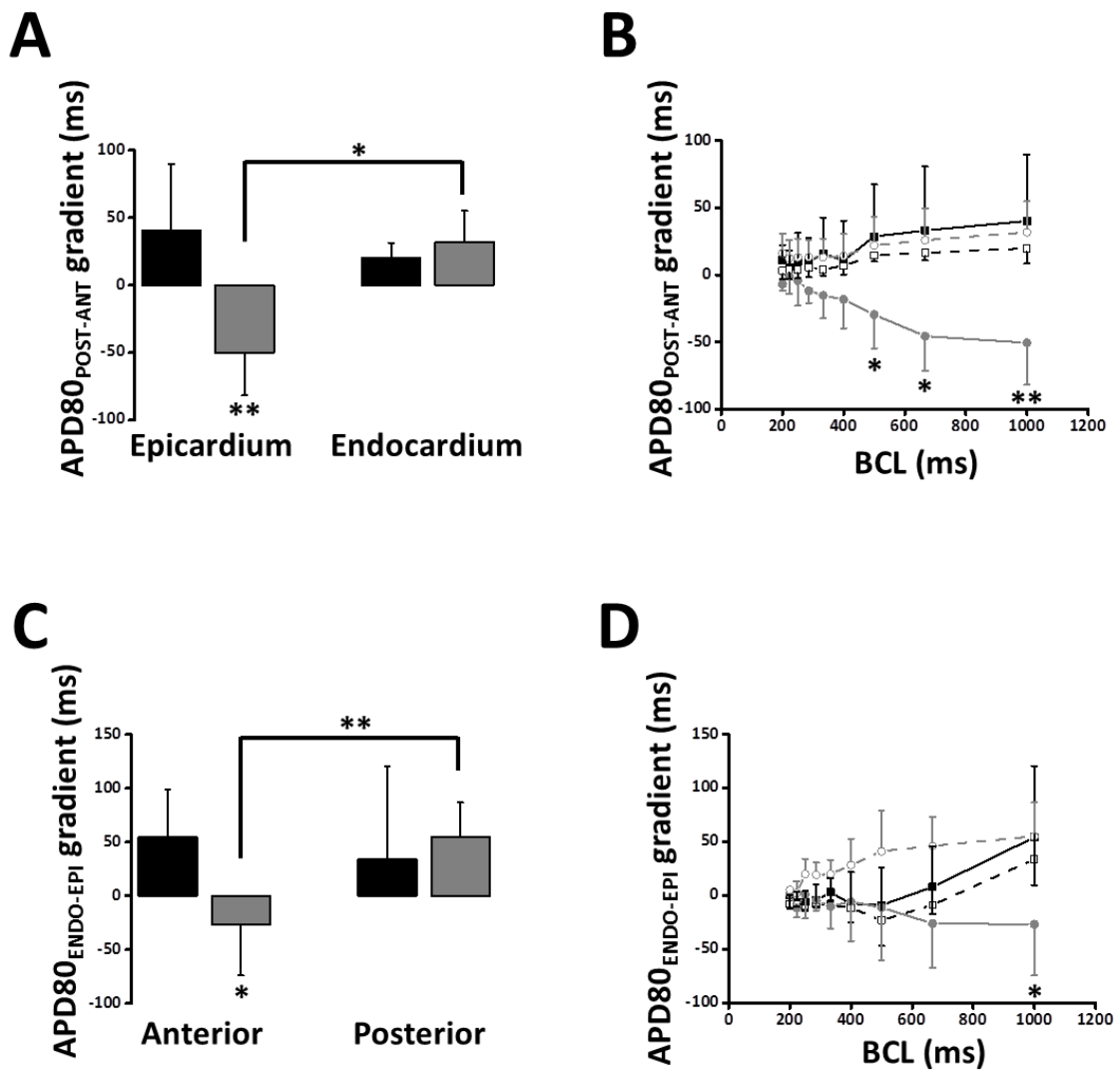


Figure 3

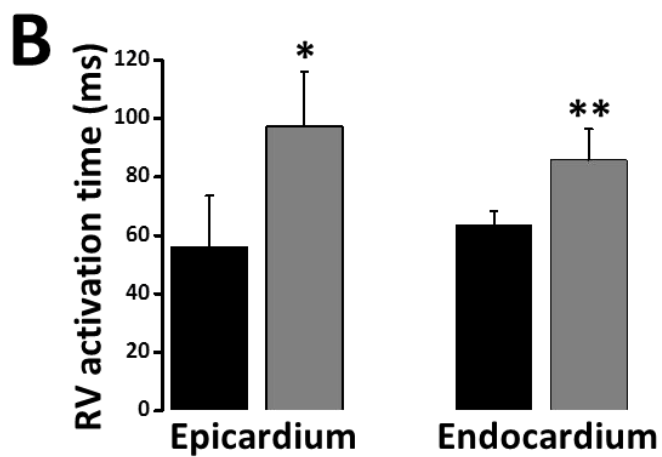
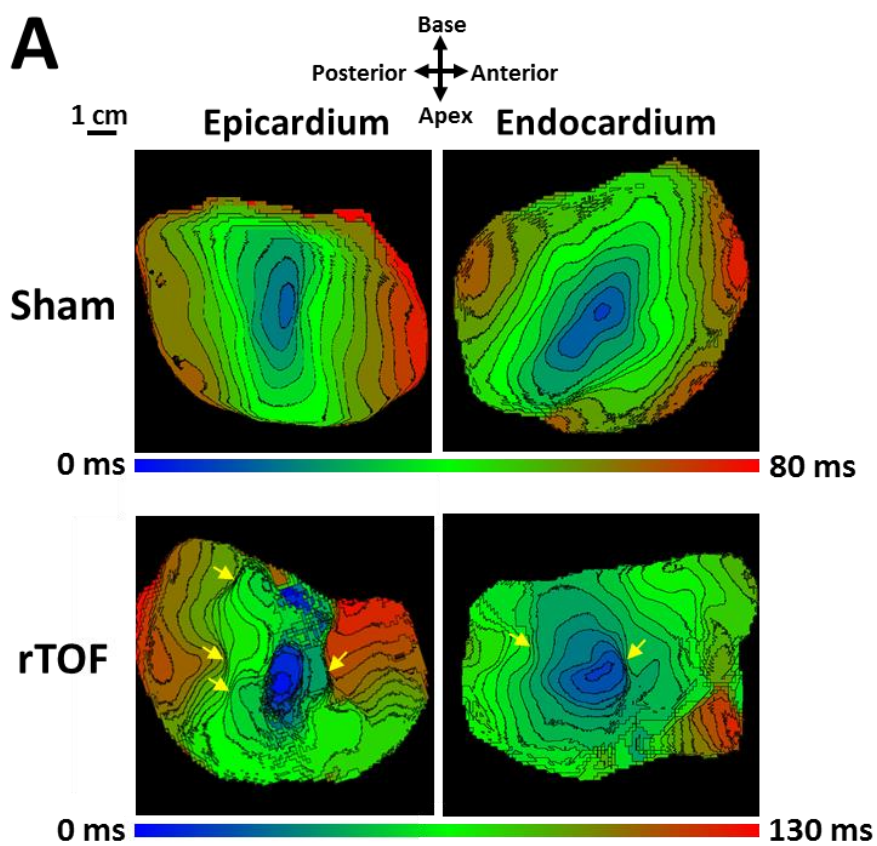


Figure 4

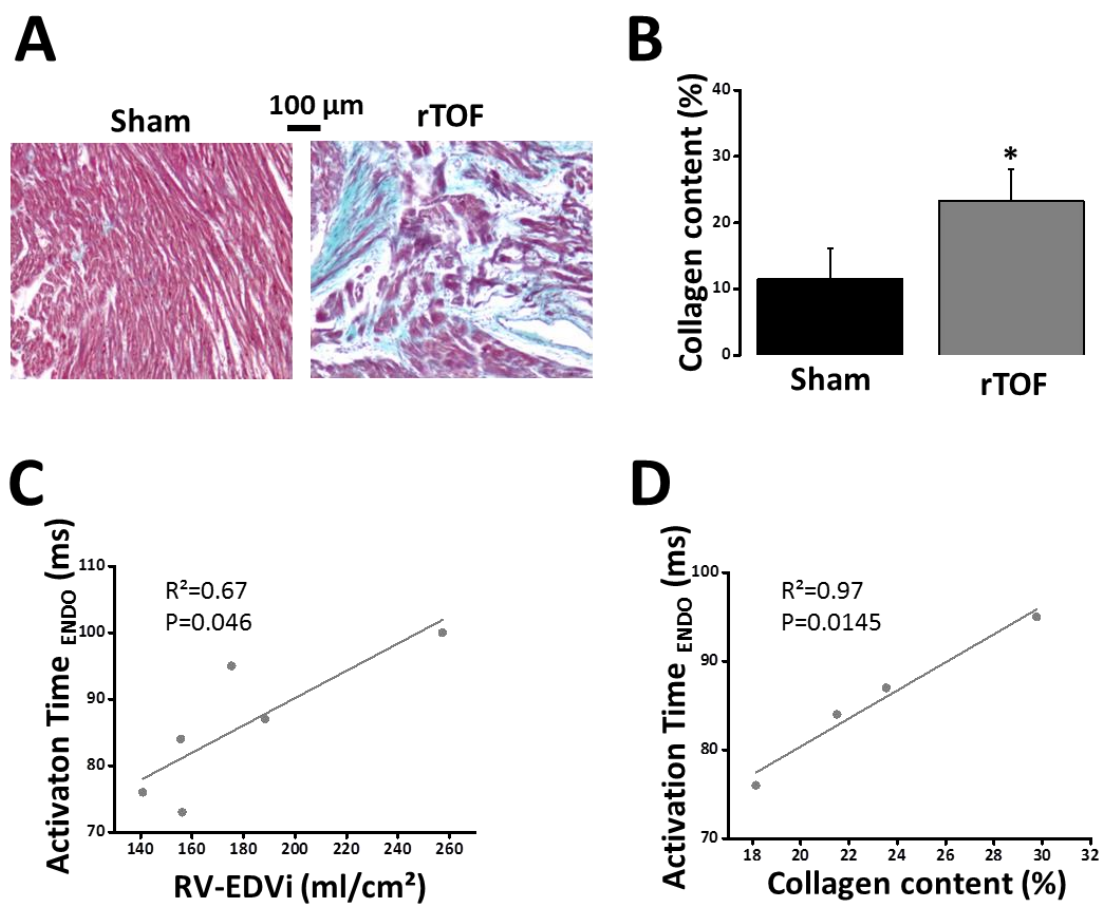


Figure 5

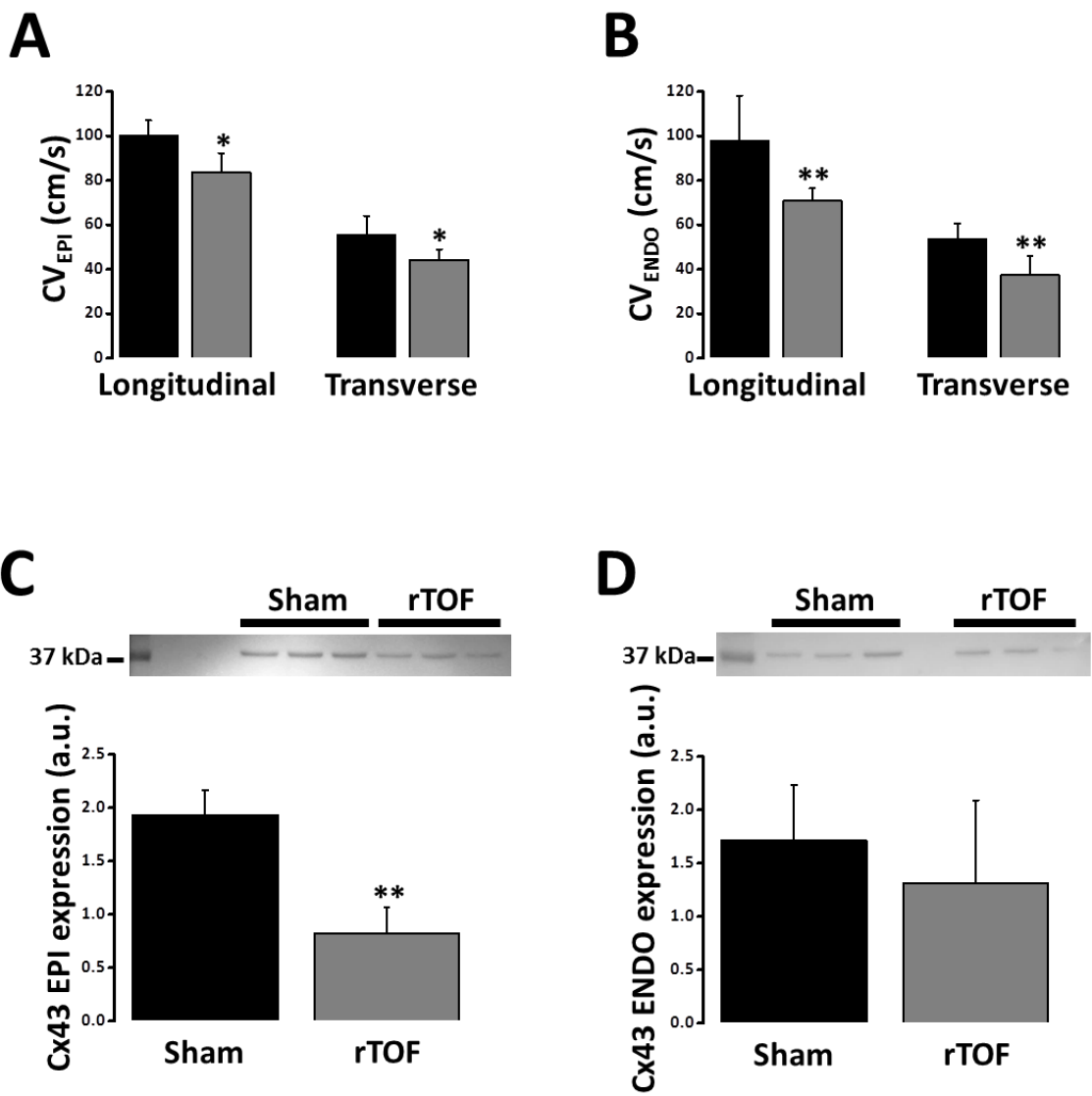


Figure 6

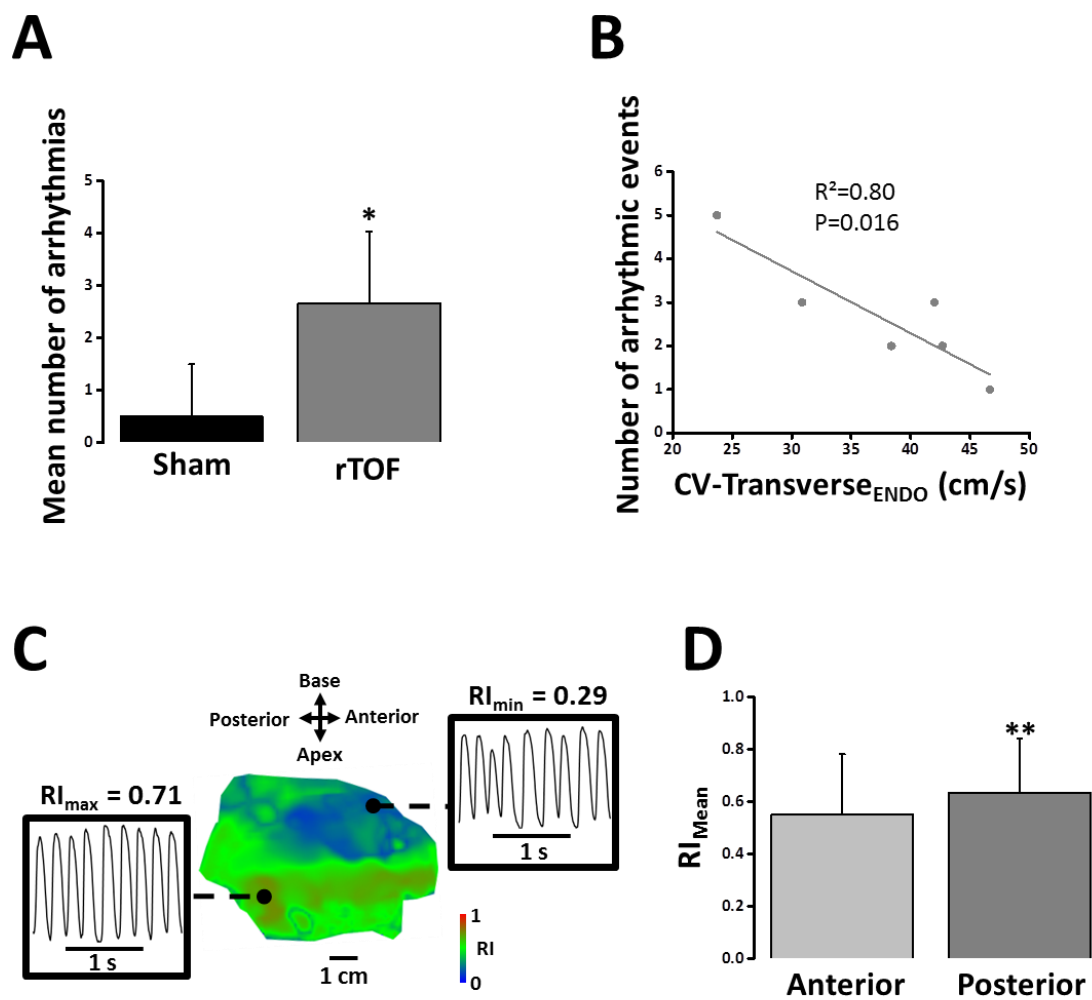


Figure 7

SUPPLEMENTAL METHODS

Animal Model

The animal model of repaired TOF (rTOF N=6) was produced as previously described (Thambo et al., 2012). Briefly, Large White piglets (< 12kg) were pre-medicated with ketamine (10 mg/kg, IM, Vibrac) and acepromazine (0.1 mg/kg, Vetoquinol). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (5 mg/kg, IV, Ceva) and maintained with isoflurane (2% in 100% O₂, Vibrac) after endotracheal intubation. The anterior side of the heart was accessed by lateral thoracotomy. The pulmonary artery was longitudinally clamped, a 2 cm incision was made across the pulmonary annulus and 2 pulmonary valve leaflets were excised. A PTFE patch was sewn across the annulus and pulmonary artery banding was performed using a loose-tied tape (2 cm diameter). For sham-operated animals, only the lateral thoracotomy was performed (Sham N=4). At the end of the procedure, piglets received supplemental oxygen and analgesia as appropriate before their transfer to the animal house. Cardiac function and remodeling was assessed 23 ± 1 weeks post-surgery as detailed below.

Cardiac Magnetic Resonance Imaging

Pigs were pre-medicated and anaesthetized as described above. A conventional cardiac magnetic resonance (CMR) examination was carried out as described in Bogaert et al (Bogaert, 2012), using a Siemens Magnetom Avanto 1.5T MRI scanner (Erlangen, Germany) with maximum gradient strength of 200 mT/m and a slew rate of 45 mT/m/ms. Briefly, pigs were placed in dorsal recumbancy (supine) and ECG leads placed after shaving and hair removal with thioglycolic acid/KOH cream (Veet, Reckitt Benckiser, UK) and the telemetric vector electrocardiogram was used for gating of the Siemens CMR sequences. All images were taken during end-expiratory ventilation stop. Localizer views were followed by right-ventricular short-axis True FISP cine-image stacks (from the cardiac apex to the level of the pulmonary valve) under manual-breathhold. For pulmonary artery flow measurement phase-contrast MRI was carried out under manual-breathhold with the velocity encoding (VENC) set to 130 cm/s and the acquisition plane set parallel to and 1 cm above the pulmonary valve plane. CMR analysis was performed by a single investigator. Quantification of ventricular function was carried out using the Siemens syngo ARGUS Ventricular Function software package with manual drawing of a right ventricular endocardial contour, from which RV end-systolic, end-diastolic, stroke volume and ejection fraction were determined. These values were indexed to body surface area (BSA) using the equation from Kelley et al (Kelley et al., 1973). The pulmonary regurgitation fraction was calculated using the Siemens syngo ARGUS Flow software package with the rephased images used to draw the analysis ROI and quantification calculated from the phase images. Pulmonary regurgitation fraction was calculated as the ratio of pulmonary retrograde to antegrade flow volume (expressed as a percentage) (Bove et al., 2012).

Euthanasia and cardiac harvesting

Following a median sternotomy to expose the heart, animals received an intravenous dose of heparin (200 UI/kg, PanPharma) and were euthanised by injection of sodium pentobarbital (10 mL from 200 mg/mL stock). The heart was quickly excised, the aorta cannulated and the myocardium flushed with an ice-cold cardioplegic solution containing (in mM): 110 NaCl, 1.2 CaCl₂, 16 KCl, 16 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 9 Glucose supplemented with Heparin (2500 UI/L). The heart and, after careful dissection, the RV wall were weighed.

Optical mapping of cardiac electrical activity

The right coronary artery was cannulated at the ostium level and perfused with cardioplegic solution while suturing major arterial leaks. The RV was installed in a chamber, immersed and perfused (20 mL/min) with a modified Krebs-Henseleit solution (37°C) containing (in mM): 130 NaCl, 24 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 5.6 Glucose, 4 KCl, 1.8 CaCl₂ constantly gassed with 95% O₂ - 5% CO₂. The preparation was electrically stimulated in the mid-free wall region using bipolar electrodes at 1.5

time threshold. Contraction was abolished using the electro-mechanical uncoupler blebbistatin (10 μ M, Enzo Life Sciences) before loading with a 10 μ M bolus of di-4-ANEPPS (Biotium). The dye was excited using 530 nm LEDs and the voltage-sensitive fluorescent light separated using a 650 ± 50 nm filter. Fluorescent signals were recorded subsequently from the epi- and endocardial surfaces at 1 kHz using a MiCam Ultima CMOS camera (SciMedia USA Ltd) with a spatial resolution of 1 x 1 mm. Pacing frequency was increased from 1 Hz to 5 Hz by 0.5 Hz increments to construct restitution curves and arrhythmias occurring during these protocols were quantified. Prior to data analysis, background fluorescence was subtracted and signals were filtered (3 x 3 spatial and 3 x 3 cubic filter). A mask was applied to the camera image in order to remove noisy areas due to remaining epicardial adhesions. Action potential duration was measured at 20% (APD20) and 80% repolarization (APD80) in 5 x 5 mm regions set on the anterior and posterior side of the RV at mid-height between base and apex. APD80 dispersion was calculated as the difference between the 95th and the 5th percentile of the APD80 distribution across the RV. Transmural APD20 and APD80 gradient (APD_{ENDO-EPI} gradient) was obtained by subtracting the epicardial APD from the endocardial value of the same region. RV posterior to anterior APD20 and APD80 gradient (APD_{POST-ANT} gradient) was calculated for the epicardium and the endocardium by subtracting anterior APD to the posterior value. Local activation times were calculated at 50% of the action potential upstroke and total epicardial and endocardial activation time was calculated as the time difference between the earliest and the latest activation time across each RV surface. Conduction velocity was measured at proximity of the pacing site by measuring the distance covered by the wavefront over a 20 ms interval in the direction of fast (longitudinal) and slow (transverse) propagation. Arrhythmia dominant frequency was assessed by Fourier transform analysis and regularity index calculated as the transform power at the dominant frequency normalized to total power.

Histological studies

Immediately after RV dissection, transmural blocks (1.5 x 1.5 cm) of myocardium were taken from the apex of the RV and fixed in 4% paraformaldehyde (Sham, rTOF N=4). The samples were then dehydrated by successive immersions into increasing (70%, 90%, 100%) ethanol concentrations, rinsed with Toluene, embedded in paraffin and stored at -20°C until use. After serial transmural sectioning of the sample (8 μ m thickness), sections were mounted on slides and stained with Masson's Trichrome using a HMS 70 slide stainer. Images were obtained at a 10X magnification on a Nikon Eclipse 80i microscope equipped with a CCD camera and saved using NIS Elements 3.2 software. Analysis was performed blindly by color thresholding using ImageJ software. Blue-stained areas corresponding to collagen were expressed as a percentage of the section total area. Perivascular and epicardial collagen staining were excluded from the quantification.

Western blot

Tissue samples were homogenized in RIPA buffer (Sigma Aldrich) supplemented with proteases and phosphatases inhibitor cocktails (Sigma Aldrich) and sonicated. Proteins were then extracted by centrifugation at 12 000 g for 15 min at 4°C, their concentration determined by bicinchoninic acid assay (Thermo Scientific) and kept at -80°C until use. Proteins (50 μ g) were separated on 12% acrylamide gels (TGX Stain-Free precast gels, Bio-Rad), under reducing conditions followed by semi-dry transfer (Trans-blot Turbo, Bio-Rad). PVDF membranes were then probed with primary antibodies (Connexin-43, 1:500, Sigma-Aldrich; Kv4.3, 1:200, Merck Millipore) overnight followed by secondary antibodies (Goat anti-rabbit, 1:2000, Bio-Rad). Following total hybridized protein imaging under UV light, Connexin-43 and Kv4.3 specific signals were revealed by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific). Signal quantification was performed using ImageJ (NIH) and specific band intensity was normalized to the total protein intensity of each lane.

RNA extraction

Total RNA was extracted from tissues using QIAzol reagent (Qiagen, USA). RNA was purified and DNase-treated using a Qiagen RNeasy® Kit. RNA purity and integrity, were assessed both by

spectrophotometry (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies) and nanoelectrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

Quantitative RT-PCR of ion channels

Sequences for primers were obtained from Ensembl Genome Browser. Primers were designed using Primer designing tool (NCBI) and synthesized at Sigma Aldrich. 1 µg of RNA was reversed transcribed using a cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed in a 25 µL reaction volume (2 µL cDNA, 12,5 µL of SYBR® Premix (BIO-RAD), a volume of 10 µM upstream and downstream primers respectively, and added ddH₂O to 25 µL) on the Bio-Rad C 100 Touch Thermal Cycler / CFX96 Real time System. Real-time PCR conditions were as follows: 3 min at 95.0 °C, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 30 s followed by 30 s annealing and elongation at 60 °C. Efficiency of primer pairs was previously evaluated. Melting curves were obtained at the end of each run to confirm a single PCR product. All samples were run in triplicate. Non-template controls were included in each run to exclude contamination and nonspecific amplification. Expression levels of samples were normalized by using a normalization factor calculated by the software CFX Manager (Bio-Rad). This normalization factor was calculated based on RT-qPCR results for two selected reference genes, *HPRT1* and *GUSB*.

Microarray profiling of RV endocardium gene expression

cDNA was synthesized from 200 ng of total-RNA using the direct cDNA Labeling System. Aminoallyl-cRNA was synthesized from cDNA using the Superscript Indirect cDNA Labeling System. The cRNA was purified using RNeasy QIAGEN RNeasy® Kit.

Labeling and hybridization of the cRNA was performed with Agilent Whole Porcine Genome Oligo Microarrays (one-color platform), according to the manufacturer's protocols. The slides were scanned and analyzed using the histogram method with default settings in an Agilent G2565C Microarray Scanner System with SureScan Technology. Analysis of microarray data was performed using Genespring® software (Agilent Technologies), with a p-value corrected by Benjamini Hochberg False Discovery Rate (FDR).

Data analysis

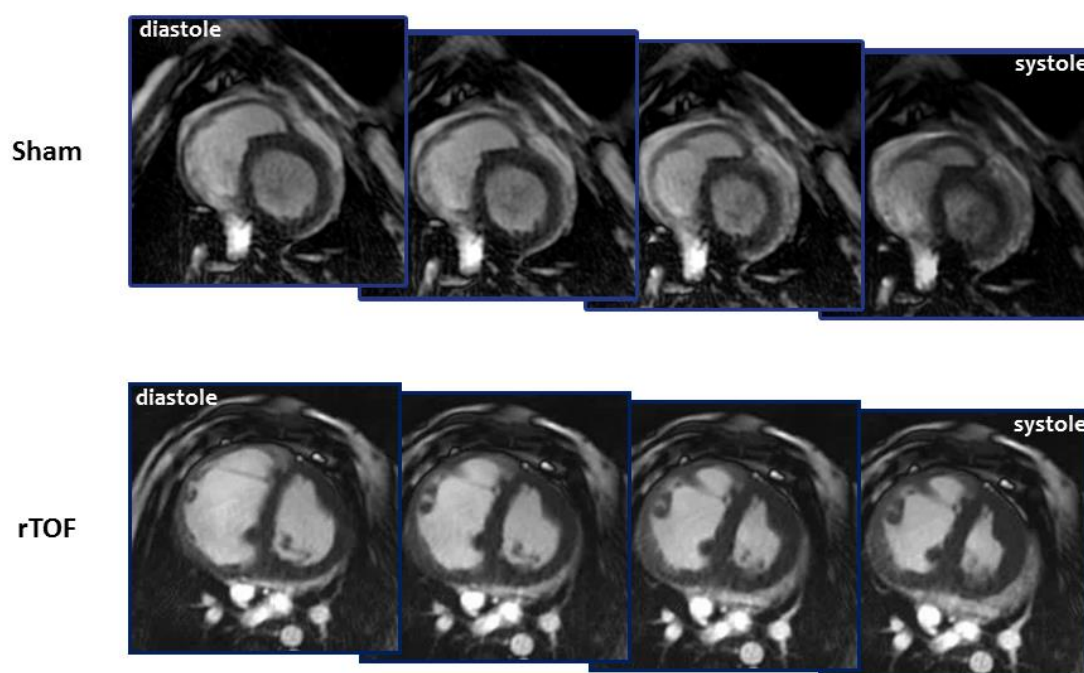
Data are expressed as means ± SD. Statistical analysis was performed using SigmaStat software. Statistical differences between groups were tested using unpaired or paired Student tests or their non-parametric equivalent and linear regression as appropriate. Statistically significant difference was assumed for $P < 0.05$.

SUPPLEMENTAL TABLES

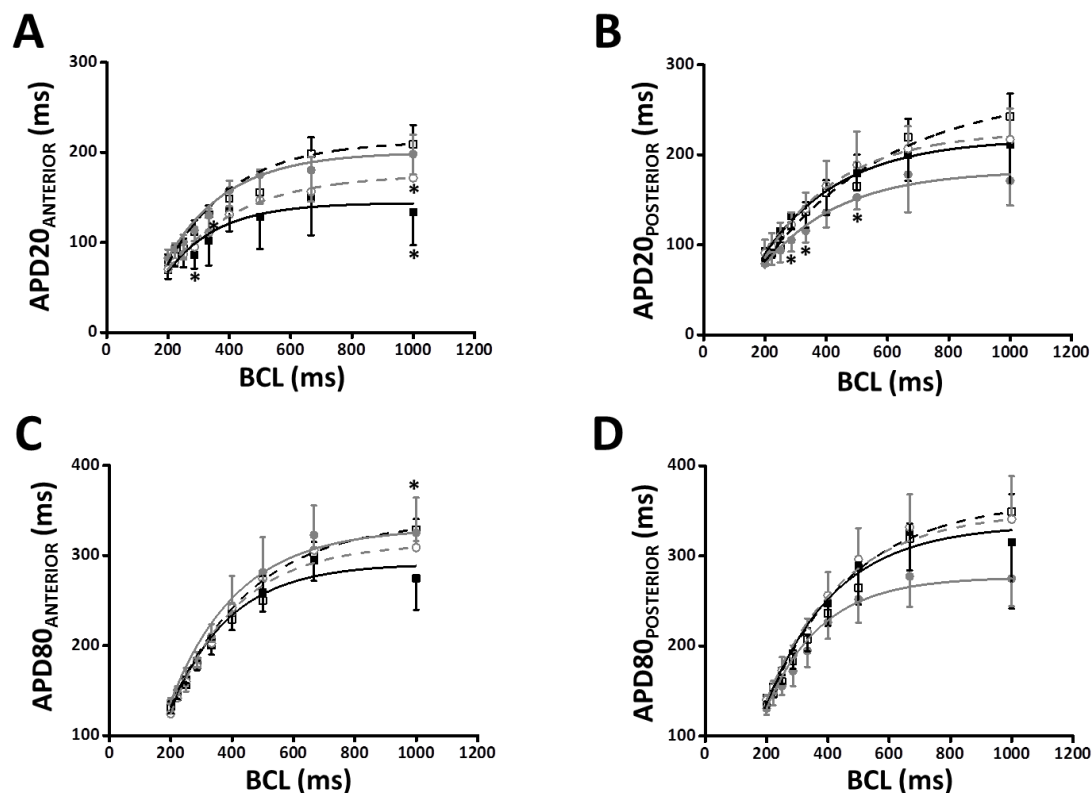
Gene Symbol	Gene description	Fold Change	Regulation
BNP	Brain natriuretic peptide	13.5	Up
FRZB	Frizzled-related protein	9.2	Up
KRT18	Keratin 18	6.5	Up
CILP	Cartilage intermediate layer protein	4.9	Up
FGF9	Fibroblast growth factor 9	3.9	Up
CTHRC1	Collagen triple helix repeat containing 1	3.6	Up
COL8A1	Collagen type VIII, alpha 1	3.1	Up
TNC	Tenascin-C	2.9	Up
GHRH	Growth hormone releasing hormone	2.8	Up
PN-1	Nexin-1	2.8	Up
MT1A	Metallothionein 1A	2.7	Up
COMP	Cartilage oligomeric matrix protein	2.5	Up
MMP11	Matrix metalloproteinase 11	2.4	Down
INHHA	Inhibin, alpha	2.2	Up
LGALS1	Lectin galactoside-binding, soluble	2.2	Up
HYAL1	Hyaluronoglucosaminidase	2.1	Up
IGFBP2	Insulin-like growth factor binding protein 2	2.1	Up
IL18	Interleukin 18	2	Up
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1	2	Up
MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	1.6	Up
LOC100627866	Transforming growth factor beta regulator 1-like	1.5	Up
KLF6	Kruppel-like factor 6	1.4	Down

Supplemental Table 1 – Microarray analysis of extracellular matrix-related gene expression in the anterior RV endocardium. Changes in gene expression were determined in rTOF and Sham endocardial samples from the anterior RV using cRNA microarrays. Twenty-two genes constitutive or regulating the extracellular-matrix were differentially expressed (up- or down-regulated) in the rTOF compared to Sham with a fold change between 1.4 and 13.5. Corrected p-values < 0.05 for all 22 genes. Sham N=5, rTOF N=7.

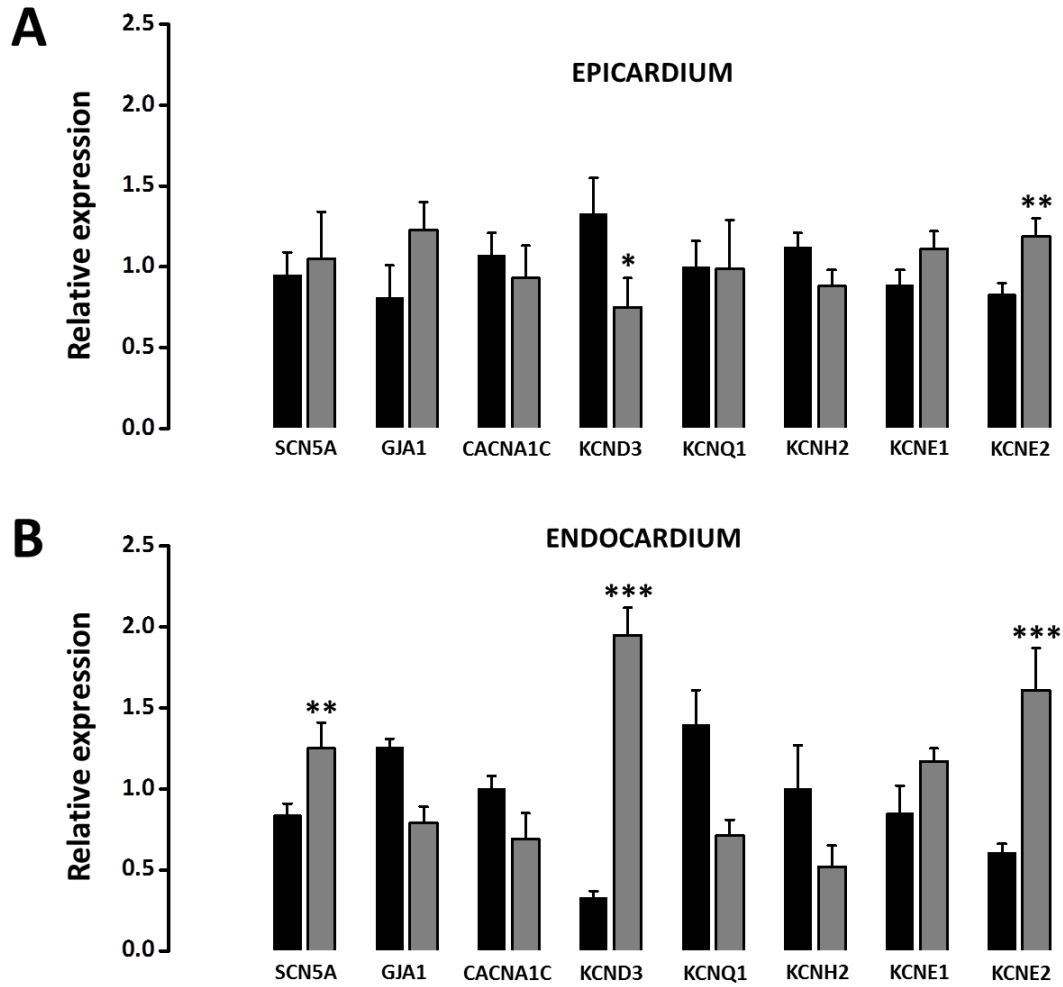
SUPPLEMENTAL FIGURES



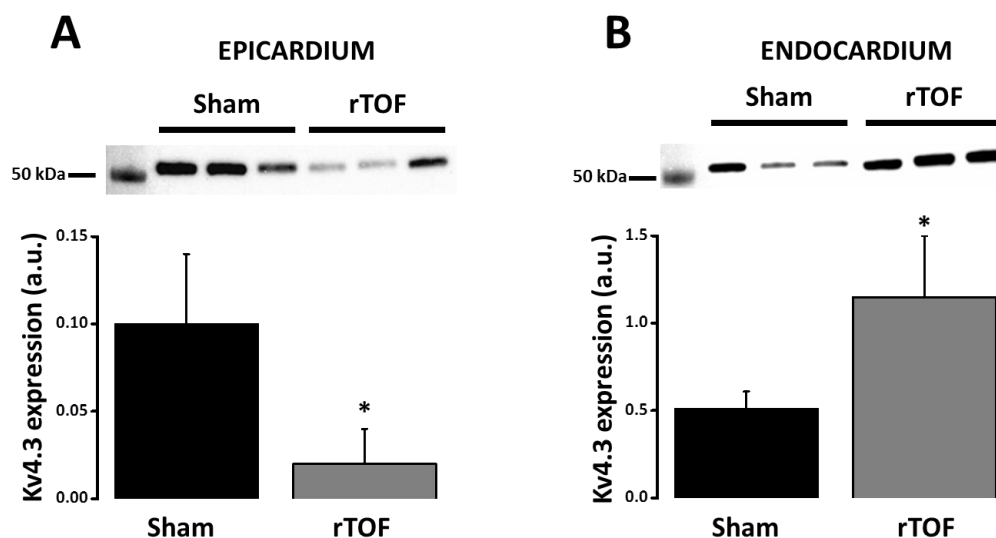
Supplemental Figure 1 – Sequential images of a Sham and rTOF heart during a cardiac cycle. Cardiac MRI (cMRI) equatorial short axis slices from a cine loop of the heart of a Sham and a rTOF pig showing evenly temporally separated images from diastole (left panel) to systole (right panel). RV hypertrophy and dilatation can be observed in rTOF images. Note the presence of a leftward interventricular septum bulging in rTOF images.



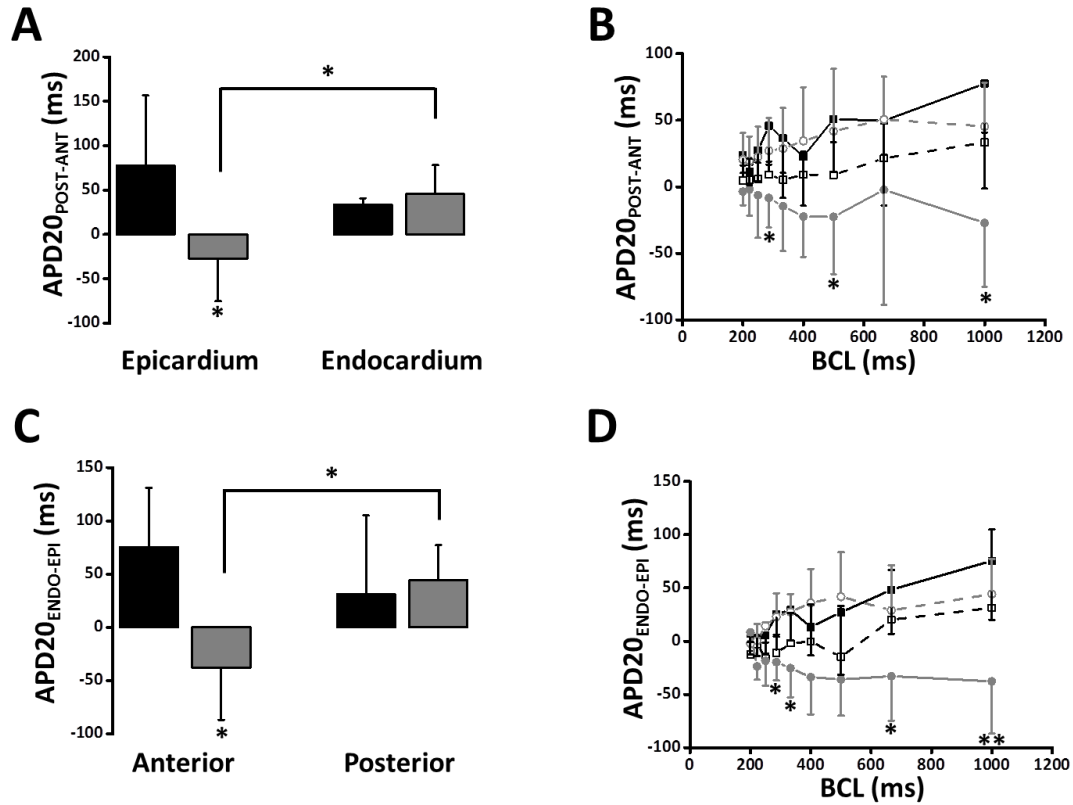
Supplemental Figure 2 – Regional action potential duration restitution in Sham and rTOF RVs. APD₂₀ restitution in the RV anterior (A) and posterior (B) regions of Sham (black) and rTOF (grey) epicardium (solid lines) and endocardium (dashed lines). APD₈₀ restitution in the RV anterior (C) and posterior (D) regions of Sham and rTOF (grey) epicardium (solid lines) and endocardium (dashed lines). APD₂₀ and APD₈₀ restitution properties were similar for both groups in all regions with the exception of rTOF posterior epicardial APD₂₀ values that became significantly shorter than in Sham. Data are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$ Sham vs. rTOF in the epicardium. Sham N=4, rTOF N=5-6.



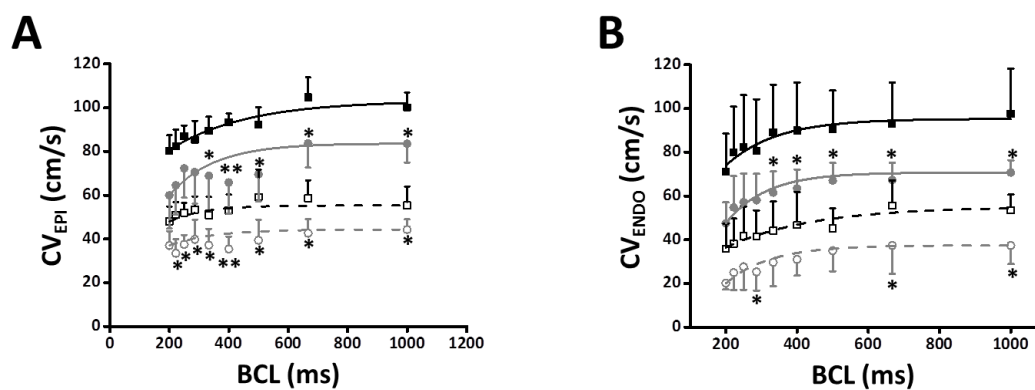
Supplemental Figure 3 – mRNA expression of the main ventricular ion channels in the anterior RV of Sham and rTOF pigs. (A) In the epicardium, the expression of KCND3 (Kv4.3) was significantly downregulated and KCNE2 (MiRP1) was significantly upregulated in rTOF (grey) compared to Sham (black) RVs. (B) In the endocardium, mRNA levels for SCN5A (Nav1.5), KCND3 and KCNE2 were significantly increased in rTOF compared to Sham RVs. Note the difference in transmural regulation of KCND3. Transcript expression was normalized to the expression of GUSB and HPRT1. Data are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Sham $N=5$, rTOF $N=7$.



Supplemental Figure 4 – Kv4.3 protein expression in the anterior endocardium of Sham and rTOF RVs. Kv4.3 expression was decreased in the anterior epicardium (**A**) but increased in the endocardium (**B**) of rTOF RVs (grey) compared to Sham (black). Kv4.3 band intensity was normalized to total hybridized proteins (see Methods). Data are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$, Sham N=3, rTOF N=3.



Supplemental Figure 5 – APD20 gradients in the right ventricle of Sham and rTOF pigs. (A) RV antero-posterior APD80 gradient (APD20_{POST-ANT}) was reversed in rTOF (grey) epicardium and significantly different from Sham (black) epicardial and rTOF endocardial gradients at 1 Hz pacing frequency. (B) RV Antero-posterior APD20 gradient at different basic cycle lengths (BCL) from Sham (black) epicardium (solid line), endocardium (dashed line); and rTOF (grey) epicardium (solid line) and endocardium (dashed line). (C) RV transmural APD20 gradient (APD20_{ENDO-EPI}) was reversed and significantly different from Sham in the anterior region while remaining unchanged in rTOF posterior region upon pacing at 1 Hz. (D) RV transmural APD20 gradient at different BCL from Sham anterior, posterior RV; and rTOF anterior and posterior RV. Data are means $\pm$ SD. ** P < 0.01, * P < 0.05, Sham N=4, rTOF N=5-6.



Supplemental Figure 6 – Conduction velocity restitutions in Sham and rTOF RVs. Epicardial (A) and endocardial (B) restitution of conduction velocity measured at various cycle lengths (BCL) in the longitudinal (solid lines) and transverse (dashed lines) directions in rTOF (grey) and Sham (black). Conduction velocities in the longitudinal and transverse directions were lower in rTOF than in Sham RVs over a range of pacing frequencies. Data are means $\pm$ SD. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, Sham N=4, rTOF N=5-6.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Thambo JB, Roubertie F, De Guillebon M, Labrousse L, Iriart X, Ntsinjana H, Lafitte S, Ploux S, Haissaguerre M, Roques X, Dos Santos P, Bordachar P. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2012;**154**:38-42.
2. Bogaert J. Cardiac Function. In: Bogaert J, Dymarkowski S, Taylor AM, Muthurangu V, eds. *Clinical Cardiac MRI*, Springer ed: Springer, 2012:109-165.
3. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM, Anderson CR. Body surface area of female swine. *J Anim Sci* 1973;**36**:927-930.
4. Bove T, Bouchez S, De Hert S, Wouters P, De Somer F, Devos D, Somers P, Van Nooten G. Acute and chronic effects of dysfunction of right ventricular outflow tract components on right ventricular performance in a porcine model: implications for primary repair of tetralogy of fallot. *J Am Coll Cardiol* 2012;**60**:64-71.

III/ Article 2 : Substrat arythmogène dans le ventricule gauche d'un modèle porcin mimant la tétralogie de Fallot

Arrhythmogenic remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired tetralogy of Fallot.

Virginie Dubes, MSc^{1,2*}; David Benoist, PhD^{1,2*}; François Roubertie, MD, PhD^{1,2,3}; Stephen H. Gilbert, PhD^{1,2,4}; Marion Constantin, MSc^{1,2}; Sabine Charron, MSc^{1,2}; Delphine Elbes, PhD^{1,2,5}; Delphine Vieillot, TA⁶; Bruno Quesson, PhD^{1,2}; Hubert Cochet, MD, PhD^{1,2,3}; Michel Haïssaguerre, MD^{1,2,3}; Caroline Rooryck, MD, PhD⁷; Pierre Bordachar, MD, PhD^{1,2,3}; Jean-Benoit Thambo, MD, PhD^{1,2,3}; Olivier Bernus, PhD^{1,2}

¹IHU LIRYC, L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque, Fondation Bordeaux Université, Bordeaux, France

²Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

³CHU de Bordeaux, Hôpital Cardiologique du Haut-Lévêque, Pessac, France

⁴Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany

⁵University of Oxford, Institute of Biomedical Engineering, Oxford, United-Kingdom

⁶Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Université de Bordeaux, Pessac, France

⁷E.A. 4137, Maladies Rares : Génétique et Métabolisme, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author:

Prof. Olivier Bernus
IHU LIRYC
PTIB - hôpital Xavier Arnoz
Avenue Haut Leveque
33604 Pessac
France
Email: olivier.bernus@u-bordeaux.fr
[Phone : +33\(0\)5 57 10 28 81](tel:+330557102881)

Abstract

Background - Ventricular arrhythmias are frequent in patients with repaired tetralogy of Fallot but their origin and underlying mechanisms remain unclear.

Objectives - In this study, the involvement of left ventricular (LV) electrical and structural remodelling was assessed in an animal model mimicking tetralogy of Fallot postoperative sequelae.

Methods - Piglets underwent a tetralogy of Fallot repair-like surgery (rTOF N=6) or were sham-operated (Sham N=5). Twenty three weeks post-surgery cardiac function was assessed in vivo by MRI. Electrophysiological properties of coronary-perfused LVs were characterized by optical mapping. LV fibrosis and connexin-43 localization were quantified on histological sections and protein expression assessed by Western blot.

Results - Right ventricular dysfunction was evident while LV function remained unaltered in rTOF pigs. LV action potential duration (APD) was significantly longer on the epicardium (Sham 280 ± 50 ms; rTOF 390 ± 76 ms) and endocardium (Sham 301 ± 20 ms; rTOF 403 ± 34 ms) of rTOF animals ($P < 0.05$) and may be related to a decrease in $K_{v7.1}$ expression ($P < 0.05$). Epicardial conduction velocity (CV) was significantly reduced in the longitudinal direction in rTOF LVs (65.37 ± 6.76 cm/s vs 51.27 ± 0.57 cm/s; $P < 0.05$) but not in the transverse direction compared to Sham. An elevated collagen content was found in the LV of rTOF pigs, in apical and basal LV sections (Sham apex $19.1 \pm 4.3\%$; rTOF apex $37.8 \pm 10.6\%$) ($P < 0.05$). A trend for Connexin43 lateralization with no change in protein expression was found in the LV of rTOFs.

Conclusions - We found a substrate for re-entrant arrhythmias with prolonged APD, increased repolarization time dispersion and reduced CV_L in the LV of rTOF pigs. This remodeling precedes LV dysfunction and is likely to contribute to ventricular arrhythmias and sudden cardiac death in patients with repaired tetralogy of Fallot.

Keywords - Tetralogy of Fallot, left ventricle, action potential duration, conduction, and fibrosis

Abbreviations list:

APD: Action potential duration

CV_L: Longitudinal conduction velocity

CV_T: Transverse conduction velocity

Cx43: Connexin 43

ERP: Effective refractory period

LV: Left ventricle

EDVi: End-diastolic volume normalized to body surface area

EF: Ejection fraction

ESVi: End-systolic volume normalized to body surface area

SVi: Stroke volume normalized to body surface area

rTOF: repaired tetralogy of Fallot

RV: Right ventricle

SCD: Sudden cardiac death

TOF: Tetralogy of Fallot

Introduction

Tetralogy of Fallot (TOF) is the most common cyanotic congenital heart disease occurring in approximately 1 in 3000 births (Villafane et al., 2013). It is characterized by subpulmonary stenosis, a subaortic ventricular septal defect, dextroposition of aorta, and right ventricular hypertrophy (Bailliard and Anderson, 2009). Intracardiac repair has excellent short term outcomes but the incidence of late complications increases in parallel with a growing adult survivor population (Schultz and Wernovsky, 2005).

Prior studies have reported on the impact of functional and electrophysiological modifications focusing mainly on the right ventricle (RV) in repaired tetralogy of Fallot (rTOF) patients (Gatzoulis et al., 1995). Pulmonary insufficiency is the most common postoperative complication in rTOF patients leading to the chronic RV volume overload and RV dysfunction (Marie et al., 1992). Moreover RV dilatation (Buddhe et al., 2015) often observed in rTOF patients is associated with a prolongation of QRS which can increase the risk of malignant ventricular arrhythmia and sudden death (Balaji et al., 1997; Gatzoulis et al., 1995). RV global inhomogeneity of electrical depolarization and repolarization (Shanmugam et al., 2013) is linked to inhomogeneity of ventricular contraction and relaxation (Vogel et al., 2001). Areas of dense fibrosis owing to surgical incision (ventriculotomy or tranpulmonary interventions, ventricular septal defect repair) determined regions of conduction block named isthmuses that define reentry circuit (Moore et al., 2013; Zeppenfeld et al., 2007). In this context, ventricular arrhythmia and sudden cardiac death (SCD) occurring late after surgery are frequent (Gatzoulis et al., 2000b).

However, there is recent evidence showing that rTOF patients not only develop RV dysfunction but also altered LV properties and function due to ventricular-ventricular interaction (Broberg et al., 2016; Chen et al., 2016; Cheung et al., 2009; Kavey et al., 1984; Zile and Gregg, 2016). Furthermore, previous experimental studies have shown that pressure overload-induced RV hypertrophy can be associated with an arrhythmic remodeling of the LV (Benoist et al., 2011; Hardziyenka et al., 2012).

Our team has previously developed a porcine model of repaired TOF in which significant RV dysfunction has been observed (Thambo et al., 2012). The goal of the present study was to verify the hypothesis that inter-ventricular interactions in rTOF may lead to left ventricular electrical and structural remodeling (Thambo et al., 2012) predisposing patients to ventricular arrhythmias and sudden cardiac death.

Methods

See online supplementary material for detailed methods.

Animal Model

Large White newborn piglets (<12 kg) were used in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and with approval of the local ethical committee.

Animals were sedated with ketamine (10 mg/kg, intramuscular (IM), Vibrac) and acepromazine (0.1 mg/kg, IM, Vetoquinol). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (5 mg/kg, intravenously (IV) Ceva) and maintained with isoflurane (2% in 100% oxygen, Vibrac) following endotracheal intubation.

Following a left thoracotomy, 2 pulmonary valve leaflets were excised, a polytetrafluorethylene patch was sewn across the pulmonary infundibulum and a loosely tied tape was passed around the artery.

Six animals underwent repaired surgery (rTOF) and five control animals were sham-operated (Sham) for which only the lateral thoracotomy was performed.

Animals were then studied at 23 ± 1 weeks post-surgery to assess cardiac function and electrophysiological remodeling.

Cardiac magnetic resonance

Upon return in the lab, animals were sedated and anaesthetized as explained above. A cardiac magnetic resonance exam was performed using a Siemens Magnetom Avanto 1.5T MRI scanner (Erlangen, Germany).

After the MRI acquisition, pigs were euthanized by injection of sodium pentobarbital (10 mL from 200 mg/mL stock) and their hearts were rapidly excised. The aorta was cannulated and rinsed with an ice-cold cardioplegic solution. The hearts and the LV were dissected and weighed.

Optical mapping of anterior LV wedges

The anterior LV was dissected and the left anterior descending coronary artery was cannulated and perfused with cardioplegic solution while suturing arterial leaks. The wedge was then installed in a bath (37°C) and perfused at constant flow rate (20 mL/min) with modified Krebs-Henseleit solution containing (in mM): 130 NaCl, 4 KCl, 24 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 5.6 Glucose, and 1.8 CaCl₂, pH 7.4 with 95% O₂ and 5% CO₂, 37°C. Following electro-mechanical uncoupling using blebbistatin (10 µM, Enzo Life Sciences) the preparation was loaded with the voltage-sensitive dye di-4ANEPPS (10 µM in bolus, Biotium). Fluorescence emitted upon excitation at 530 nm (MacroLED, Cairn Research) was filtered at 650 ± 50 nm and recorded from both epi- and endocardial surfaces with two MicamUltima CMOS camera (SciMedia USA Ltd) at 1 mm spatial resolution.

The wedge was paced (1-5 Hz) at the base of epicardium to investigate restitution properties. EPI and ENDO action potential durations were measured at 80% of repolarization (APD₈₀) in 5 x 5 mm regions at the base, the mid free wall and the apex of the anterior LV. APD₈₀ and repolarization time dispersion was quantified across the LV. The effective refractory period (ERP) was measured by an S1-S2 protocol. Longitudinal conduction velocity (CV_L) and transverse conduction velocity (CV_T), were measured along the directions of fastest and slowest propagation velocity from the stimulus point.

Histology

Tissue samples (1.5 x 1.5 cm) were collected from the apex and the base of the LV and fixed in 4% paraformaldehyde (Sham, rTOF N=4). Samples were immersed in ethanol for dehydration and embedded in paraffin. Transmural sections (8 µm) were stained with Masson's Trichrome. Slides were examined at 10X magnification on a Nikon Eclipse 80i equipped with a CDD camera. The interstitial collagen quantification was performed on 3 sections per animal and expressed as a percentage of total tissue area using Image J software.

Immunohistochemistry

After deparaffinization and dehydration, endogenous peroxidase activity was quenched in LV transmural sections using 3% H₂O₂, followed by antigen retrieval and blocking steps. Sections were incubated with anti-connexin 43 antibodies (mouse polyclonal, 1:250, Millipore) followed by incubation with biotinylated secondary antibodies and finally with the conjugated enzyme streptavidine peroxidase. Immunoreactive cells were stained with the chromogene 3 Amino 9 ethyl-carbazole and counterstained with Hematoxylin. Slides were examined at 40X magnification on a Nikon Eclipse 80i equipped with a CDD camera.

Western Blots

Prior to optical mapping LV free wall tissue samples were snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Proteins were extracted, titrated and separated (50 µg) on 12% acrylamide gels (TGX Stain-Free precast gels, Bio-Rad) under reducing conditions. After semi-dry transfer (Trans-blot Turbo, Bio-Rad), PVDF membranes were incubated with the primary antibodies (Connexin-43, 1:500, Sigma-Aldrich; K_v7.1, 1:400, Alomone) followed by HRP-conjugated secondary antibodies (Goat anti-rabbit, 1:2000, Bio-Rad). Total hybridized protein levels were imaged under UV light and quantified. Immunospecific signals were revealed by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific). Quantification of western blot was done with ImageJ (NIH).

Data analysis

Data are presented as mean $\pm$ SD. Differences were determined using an unpaired or paired Student test with GraphPad Prism software. A p-value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Animal model

Heart and LV weight were increased in rTOF pigs 23 ± 1 weeks post-surgery (**Table 1**). However the LV weight-to-body weight ratio was not significantly changed, highlighting the absence of LV hypertrophy in these animal models. Right ventricular function was significantly altered in rTOF pigs as highlighted by the depressed RVEF and increased end-systolic, end-diastolic volumes and pulmonary regurgitation fraction (**Table 1**). On the contrary, LV ejection fraction, cardiac output and volumes were preserved in these animals. Thus, LV function was maintained in rTOF pigs at this stage (23 ± 1 weeks post-surgery) (**Table 1**).

LV Action potential duration, restitution and dispersion

APD₈₀ measured in the mid-wall region of rTOF LVs was significantly prolonged both on the endocardium (403 ± 34 ms vs 301 ± 20 ms) and epicardium (390 ± 76 ms vs 280 ± 50 ms) compared to Sham (**Figure 1A-B**). In a regional analysis, we found that APD tended to be prolonged across the rTOF LV but statistical significance was only reached for the mid-wall epicardial and endocardial regions as well as the apical epicardium (**Supplemental Figure 1**). The effective refractory period (ERP) obtained on epicardium was significantly prolonged in rTOF animals (**Figure 1C**). In line with these observations we found a reduced K_v7.1 expression in rTOF LVs (**Figure 1D**). APD₈₀ prolongation was preserved at pacing frequencies up to 3 Hz (**Figure 2A**) and a trend for steeper APD restitution curve was observed on the epicardium (**Figure 2B**). Epicardial APD₈₀ maps highlighted an heterogeneous APD distribution across the rTOF LV as opposed to the Sham (**Figure 3A**) and this was confirmed by APD dispersion quantification (**Figure 3B**). In contrast with the epicardial side, APD dispersion was not increased in rTOF LV endocardium compared to Sham pigs (**Figure 3C**). An increased epicardial dispersion was also found at the repolarization time level but was absent in the endocardium (**Figure 3 D-E**).

LV electrical propagation properties and fibrosis

LV epicardial activation maps are shown in **Figure 4A**. The blue represents early activation time and red late activation time (5 ms spaced isochrones). Longitudinal conduction velocities were decreased in rTOF compared to Sham pigs (51.27 ± 0.57 cm/s vs 65.37 ± 6.76 cm/s) (**Figure 4B**); but transverse conduction velocities were unchanged (30.19 ± 1.97 cm/s vs 27.34 ± 3.08 cm/s) (**Figure 4C**). This resulted in an alteration of the anisotropy of propagation as indicated by the decreased longitudinal to transverse CV ratio (**Figure 4D**). Longitudinal CV was significantly decreased in rTOF at pacing frequencies up to 1.5Hz, resulting in shallower CV restitution curves (**Figure 5A**). Lateralization of connexin 43 was found in rTOF pigs (**Figure 6A**) but protein level of Cx43 was not significantly altered in rTOF pigs compared to Sham (**Figure 6B**). Masson's Trichrome staining showed large fibrotic regions in the base and apex of LV in rTOF pigs (**Figure 7A**). The quantification of collagen content confirmed the presence of a significant increase in diffuse fibrosis in rTOF LV sections compared to Sham (**Figure 7B**). Interestingly, LV collagen content correlated well with RVEDVi indicating a role for ventricular interdependence in rTOF LV fibrosis (**Figure 7C**). Moreover, a negative linear correlation as found between RVEDVi and LV CV_L (**Figure 7D**).

Discussion

In the present study we have investigated the hypothesis that inter-ventricular interactions may lead to deleterious remodeling of the left ventricle in a porcine model of repaired Tetralogy of Fallot mimicking residual pulmonary stenosis and regurgitation. We found that, despite no apparent left ventricular functional changes as assessed by cardiac MRI, significant alterations of LV electrical and structural properties were present, reminiscent of the pro-arrhythmic substrate typically found in heart failure. These findings may have important implications for risk stratification and prevention of ventricular arrhythmias in rTOF patients.

So far, experimental studies relating to TOF have primarily focused on RV dysfunction and remodeling (Chiu et al., 2015; Lambert et al., 2010; Thambo et al., 2012). However, recent work on rodent models of RV pressure-overload has provided evidence for inter-ventricular interactions and arrhythmogenic remodeling of the left ventricle. Here, we find a significant APD₈₀ and ERP prolongation in the LV epicardium and endocardium of rTOF hearts. Furthermore, we observed increased APD and RT dispersion on the LV epicardium of the rTOF animals, although no significant changes were found in transmural APD dispersion as has been previously described in various animal models of LV hypertrophy and heart failure. Finally, longitudinal conduction velocity was reduced in the rTOF group and was associated with Cx43 lateralization and increased interstitial fibrosis.

Previous studies in the rat monocrotaline model of pulmonary hypertension showed a modest prolongation of the action potential duration (Benoist et al., 2011) and ERP (Hardziyenka et al., 2012) throughout the left ventricle when compared to the right ventricle. This was mainly attributed to changes in the expression levels of the main potassium channels responsible for repolarization in rat myocardium. In our study, the prolongation of APD₈₀ was extremely pronounced, albeit not homogenous in the entire LV. Indeed, APD₈₀ was prolonged at the apex and mid free wall but not in the base of LV (see supplement). This resulted in elevated epicardial APD₈₀ heterogeneity, which may be due to heterogeneous stress and strain patterns induced by the RV dilatation and dysfunction. Similar to the rat studies, we observed a concomitant reduced expression of K_v7.1 in these animals.

Although we did not find evidence for LV hypertrophy, we did observe microstructural remodeling. It is however not excluded that the rTOF animals will develop LV hypertrophy and failure at a later stage. Furthermore, it is interesting to note that the pro-arrhythmic LV tissue remodeling occurs prior to functional changes. This observation could potentially explain the discrepancies across clinical studies aiming at investigating the role of LV dysfunction and SCD. Indeed, the relationship between LV hemodynamic dysfunction and SCD in patient with idiopathic dilated cardiomyopathy is controversial. One study has suggested that LV systolic dysfunction is an independent predictor for SCD in this pathology (Meinertz et al., 1984). Nevertheless, Ghai and colleagues have shown that LV systolic dysfunction may play a role in SCD in patients with rTOF (Ghai et al., 2002).

Our results may also have implications for other pathologies involving pulmonary hypertension or pulmonary valve regurgitations. Indeed, RV remodeling has been well characterized in these patients or in various animal models (Aguero et al., 2015), but the potential contribution of LV remodeling to mortality is less well known.

The mechanisms underlying LV remodeling in rTOF are relatively unexplored, but emerging evidence suggests that there are adverse inter-ventricular interactions (Muzzarelli et al., 2011) and RV dysfunction that drive this process (Fernandes et al., 2012). A few study have shown that RV dilatation, especially at the apex, may be important in leading to altered LV geometry and consequently to abnormal apical rotation and decreased LV efficiency (van Dalen et al., 2010). In fact, patients with corrected TOF have abnormal LV myocardial mechanics that LV twist is reduced as a result of decreased LV apical rotation (Menting et al., 2014). However, little attention has been paid to the electrical and structural remodeling of the left ventricle rTOF patients. Nevertheless, in recent clinical studies, including various cohorts of rTOF patients (ranging from children to adults having undergone different surgical procedures), increased extracellular volume indicative of diffuse myocardial fibrosis was found not only in the RV but also in the LV free wall (Kozak et al., 2014).

Furthermore, these structural changes of the left ventricle were found to correlate with RV remodeling and the occurrence of arrhythmias. Our animal study not only reproduces these recent clinical findings, but also shows that fibrosis is associated with significant electrophysiological alterations including conduction slowing and increased dispersion of repolarization, which could play a major role in the onset and maintenance of ventricular arrhythmias

Limitations

First, in the present study, animal model reproduced post-operative sequelae in TOF such as hemodynamic and electrophysiological properties in healthy pigs without underlying congenital disease. In this context, factors independent of surgery as genetic substrate (Michielon et al., 2006) and hypoxemia (Chowdhury et al., 2006) may influence the pro-arrhythmic ventricular remodeling.

Conclusion

We found a significant remodeling of LV repolarization and conduction properties in a porcine model reproducing TOF repair consequences. Our findings support the importance of inter-ventricular interactions and the presence of significant LV remodeling prior to clinical symptoms of LV dysfunction. This remodeling is likely to contribute to the arrhythmogenic substrate and SCD in corrected TOF patients.

Disclosures

None

Perspectives

Even though the left ventricular dysfunction may be sub-clinical and may go unnoticed during a cardiac exam, our study shows that a potentially life-threatening substrate may develop in the left ventricle early on after surgical repair, which could warrant the need for anti-arrhythmic therapies (such as catheter ablation) aimed not only at the RV but also the LV, or early interventions (pulmonary valve replacement) to reduce RV dilatation and deleterious inter-ventricular interactions.

References

1. Villafane J, Feinstein JA, Jenkins KJ, Vincent RN, Walsh EP, Dubin AM, Geva T, Towbin JA, Cohen MS, Fraser C, Dearani J, Rosenthal D, Kaufman B, Graham TP, Jr., Adult C, *et al.* Hot topics in tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol* 2013;62(23):2155-2166.
2. Bailliard F, Anderson RH. Tetralogy of Fallot. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:2.
3. Schultz AH, Wernovsky G. Late outcomes in patients with surgically treated congenital heart disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2005:145-156.
4. Gatzoulis MA, Till JA, Somerville J, Redington AN. Mechanoelectrical interaction in tetralogy of Fallot. QRS prolongation relates to right ventricular size and predicts malignant ventricular arrhythmias and sudden death. *Circulation* 1995;92(2):231-237.
5. Marie PY, Marcon F, Brunotte F, Briancon S, Danchin N, Worms AM, Robert J, Pernot C. Right ventricular overload and induced sustained ventricular tachycardia in operatively "repaired" tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1992;69(8):785-789.
6. Buddhe S, Shah A, Lai WW. Progression of right ventricular dilation in repaired tetralogy of Fallot. *J Magn Reson Imaging* 2015;41(3):730-737.
7. Balaji S, Lau YR, Case CL, Gillette PC. QRS prolongation is associated with inducible ventricular tachycardia after repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol* 1997;80(2):160-163.
8. Shanmugam N, Yap J, Tan RS, Le TT, Gao F, Chan JX, Chong D, Ho KL, Tan BY, Ching CK, Teo WS, Tan JL, Liew R. Fragmented QRS complexes predict right ventricular dysfunction and outflow tract aneurysms in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2013;167(4):1366-1372.
9. Vogel M, Sponring J, Cullen S, Deanfield JE, Redington AN. Regional wall motion and abnormalities of electrical depolarization and repolarization in patients after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Circulation* 2001;103(12):1669-1673.
10. Moore JP, Seki A, Shannon KM, Mandapati R, Tung R, Fishbein MC. Characterization of anatomic ventricular tachycardia isthmus pathology after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 2013;6(5):905-911.
11. Zeppenfeld K, Schalij MJ, Bartelings MM, Tedrow UB, Koplan BA, Soejima K, Stevenson WG. Catheter ablation of ventricular tachycardia after repair of congenital heart disease: electroanatomic identification of the critical right ventricular isthmus. *Circulation* 2007;116(20):2241-2252.
12. Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, Rosenthal M, Nakazawa M, Moller JH, Gillette PC, Webb GD, Redington AN. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *Lancet* 2000;356(9234):975-981.
13. Cheung EW, Liang XC, Lam WW, Cheung YF. Impact of right ventricular dilation on left ventricular myocardial deformation in patients after surgical repair of tetralogy of fallot. *Am J Cardiol* 2009;104(9):1264-1270.
14. Kavey RE, Thomas FD, Byrum CJ, Blackman MS, Sondheimer HM, Bove EL. Ventricular arrhythmias and biventricular dysfunction after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol* 1984;4(1):126-131.
15. Broberg CS, Huang J, Hogberg I, McLarry J, Woods P, Burchill LJ, Pantely GA, Sahn DJ, Jerosch-Herold M. Diffuse LV Myocardial Fibrosis and its Clinical Associations in Adults With Repaired Tetralogy of Fallot. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;9(1):86-87.
16. Chen CA, Dusenbery SM, Valente AM, Powell AJ, Geva T. Myocardial ECV Fraction Assessed by CMR Is Associated With Type of Hemodynamic Load and Arrhythmia in Repaired Tetralogy of Fallot. *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;9(1):1-10.
17. Zile MR, Gregg D. Is Biventricular Fibrosis the Mediator of Late Complications in Tetralogy of Fallot? *JACC Cardiovasc Imaging* 2016;9(1):11-13.
18. Benoist D, Stones R, Drinkhill M, Bernus O, White E. Arrhythmogenic substrate in hearts of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;300(6):H2230-2237.

19. Hardziyenka M, Campian ME, Verkerk AO, Surie S, van Ginneken AC, Hakim S, Linnenbank AC, de Bruin-Bon HA, Beekman L, van der Plas MN, Remme CA, van Veen TA, Bresser P, de Bakker JM, Tan HL. Electrophysiologic remodeling of the left ventricle in pressure overload-induced right ventricular failure. *J Am Coll Cardiol* 2012;59(24):2193-2202.
20. Thambo JB, Roubertie F, De Guillebon M, Labrousse L, Iriart X, Ntsinjana H, Lafitte S, Ploux S, Haissaguerre M, Roques X, Dos Santos P, Bordachar P. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol* 2012;154(1):38-42.
21. Lambert V, Capderou A, Le Bret E, Rucker-Martin C, Deroubaix E, Gouadon E, Raymond N, Stos B, Serraf A, Renaud JF. Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart disease: an experimental model for therapeutic innovation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139(5):1197-1204, 1204 e1191.
22. Chiu SN, Tsai CT, Lin LY, Huang SC, Chen YS, Wang JK, Wu MH, Lai LP, Lin JL. Repolarization Alternans and Ventricular Arrhythmia in a Repaired Tetralogy of Fallot Animal Model. *J Am Heart Assoc* 2015;4(12).
23. Meinertz T, Hofmann T, Kasper W, Treese N, Bechtold H, Stienen U, Pop T, Leitner ER, Andresen D, Meyer J. Significance of ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 1984;53(7):902-907.
24. Ghai A, Silversides C, Harris L, Webb GD, Siu SC, Therrien J. Left ventricular dysfunction is a risk factor for sudden cardiac death in adults late after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol* 2002;40(9):1675-1680.
25. Aguero J, Ishikawa K, Fish KM, Hammoudi N, Hadri L, Garcia-Alvarez A, Ibanez B, Fuster V, Hajjar RJ, Leopold JA. Combination proximal pulmonary artery coiling and distal embolization induces chronic elevations in pulmonary artery pressure in Swine. *PLoS One* 2015;10(4):e0124526.
26. Muzzarelli S, Ordoas KG, Cannavale G, Meadows AK, Higgins CB. Tetralogy of Fallot: impact of the excursion of the interventricular septum on left ventricular systolic function and fibrosis after surgical repair. *Radiology* 2011;259(2):375-383.
27. Fernandes FP, Manlhiot C, Roche SL, Grosse-Wortmann L, Slorach C, McCrindle BW, Mertens L, Kantor PF, Friedberg MK. Impaired left ventricular myocardial mechanics and their relation to pulmonary regurgitation, right ventricular enlargement and exercise capacity in asymptomatic children after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Soc Echocardiogr* 2012;25(5):494-503.
28. van Dalen BM, Kauer F, Vletter WB, Soliman OI, van der Zwaan HB, Ten Cate FJ, Geleijnse ML. Influence of cardiac shape on left ventricular twist. *J Appl Physiol* (1985) 2010;108(1):146-151.
29. Menting ME, Eindhoven JA, van den Bosch AE, Cuypers JA, Ruys TP, van Dalen BM, McGhie JS, Witsenburg M, Helbing WA, Geleijnse ML, Roos-Hesselink JW. Abnormal left ventricular rotation and twist in adult patients with corrected tetralogy of Fallot. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging* 2014;15(5):566-574.
30. Kozak MF, Redington A, Yoo SJ, Seed M, Greiser A, Grosse-Wortmann L. Diffuse myocardial fibrosis following tetralogy of Fallot repair: a T1 mapping cardiac magnetic resonance study. *Pediatr Radiol* 2014;44(4):403-409.
31. Michielon G, Marino B, Formigari R, Gargiulo G, Picchio F, Digilio MC, Anaclerio S, Oricchio G, Sanders SP, Di Donato RM. Genetic syndromes and outcome after surgical correction of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg* 2006;81(3):968-975.
32. Chowdhury UK, Sathia S, Ray R, Singh R, Pradeep KK, Venugopal P. Histopathology of the right ventricular outflow tract and its relationship to clinical outcomes and arrhythmias in patients with tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;132(2):270-277.

Table Legends

Table 1 - LV function, hemodynamics and anatomy.

Data were obtained 23 ± 1 weeks post-surgery. Cardiac weights were measured after dissection. Values are means $\pm$ SD. * $P < 0.05$, Sham $n=4$, rTOF $n=6$. BSA: Body surface area; EF: ejection fraction; EDVi: end-diastolic volume indexed to BSA; ESVi: end-systolic volume indexed to BSA; SVi: stroke volume indexed to BSA; PRF: pulmonary regurgitation fraction.

Figure Legends

Figure 1 - Action potential duration from Sham and rTOF LVs.

(A) Representative optical APs from the LV endocardium and epicardium of Sham (black) and rTOF (grey) pigs. (B) Endocardial and epicardial APD₈₀ were prolonged in the LV of rTOF pigs (grey) compared to Sham (black) when paced at 1 Hz. (C) LV effective refractory period was longer on the rTOF epicardium than in Sham pigs. Data are means $\pm$ SD. (D) Example and quantification of K_v7.1 western blotting showing reduced expression in the rTOF LV. *P < 0.05, **P < 0.01 Sham n=5, rTOF n=6.

Figure 2 - Dynamic action potential duration restitution in Sham and rTOF left ventricles.

(A) Mean APD₈₀ at varying basic cycle lengths (BCL) on the LV endocardium and the epicardium. APD₈₀ was prolonged on the epicardium and endocardium at different cycle lengths of rTOF (grey lines) and Sham (black lines) pigs. (B) There was a trend for an increase in epicardial APD restitution slope in rTOF compared to Sham pigs. Data are means $\pm$ SD. *P < 0.05, Sham n=5, rTOF n=6.

Figure 3 - Dispersion of repolarization in Sham and rTOF left ventricles.

(A) Representative epicardial APD₈₀ maps showing heterogeneous APD distribution in rTOF LVs paced at 1 Hz. (B) APD₈₀ dispersion was increased in rTOF compared to Sham in the epicardium but not the endocardium (C). (D) Repolarization time dispersion was increased in rTOF LV epicardium but not in the endocardium (E). Data are means $\pm$ SD. *P < 0.05, Sham n=5, rTOF n=6.

Figure 4 - Left ventricular activation and conduction velocity in Sham and rTOF preparations.

(A) Representative epicardial activation maps (5 ms-spaced isochrones) from Sham and rTOF LVs stimulated at 1 Hz. (B) Longitudinal conduction velocity (CV_L) was significantly decreased in rTOF LVs compared to Sham while transverse conduction velocity (CV_T) remained unchanged (C). (D) This resulted in a decreased CV_L to CV_T ratio in rTOF animals. Data are means $\pm$ SD. *P < 0.05, Sham n=4, rTOF n=4.

Figure 5 - Dynamic conduction velocity restitution curves in Sham and rTOF LVs. Epicardial restitution of conduction velocity measured at various cycle lengths (BCL) in the longitudinal (A) and transverse (B) directions in rTOF (grey lines) and Sham (black lines) LVs. Data are means $\pm$ SD. *P < 0.05, Sham n=4, rTOF n=4.

Figure 6 - Membrane localization and expression of Connexin 43 in Sham and rTOF LVs.

(A) Immunohistochemistry for Connexin43 (Cx43) performed on 8 μ m LV base tissue sections revealed Cx43 lateralization (arrows) in rTOF LVs as opposed to Sham LVs in which Cx43 was localized at the intercalated discs. (B) Cx43 expression was unchanged in rTOF LVs compared to Sham. Data are means $\pm$ SD. Sham n=3, rTOF n=3.

Figure 7 - Collagen content in Sham and rTOF LVs.

(A) Representative histological sections of Sham and rTOF LVs stained with Masson's Trichrome. In addition to diffuse fibrosis, large fibrotic regions are visible in the LV base and apex of rTOF pigs. (B) Collagen content, expressed as a percentage of total section area, was increased in rTOF LV base and apex compared to Sham. (C) A positive linear correlation was found between LV collagen content and

RÉSULTATS ET DISCUSSION

RVEDVi and a negative linear correlation was found between RVEDVi and LV CV_L. Data are means $\pm$ SD. *P < 0.05, Sham n=4, rTOF n=4.

	Sham (N=4)	rTOF (N=6)	p-value
Animal weights			
Body weight (kg)	48 ± 6	61 ± 11	0.05
BSA (m ²)	0.93 ± 0.07	1.04 ± 0,05	0.02
Heart weight/BSA (g/m ²)	202 ± 14	283 ± 21	0.01
LV weight/BSA (g/m ²)	113 ± 32	146 ± 13	0.14
LV function			
Heart rate (beats/min)	110 ± 15	91 ± 9	0.07
LVEF (%)	54 ± 6	61 ± 9	0.23
LV-EDVi (ml/m ²)	71 ± 16	79 ± 15	0.43
LV-ESVi (ml/m ²)	33 ± 11	31 ± 7	0.73
LV-SV (ml/m ²)	38 ± 7	48 ± 13	0.18
LV cardiac output (l/min/m ²)	4 ± 0.4	4 ± 1	0.72
RV function			
RV-EDVi (ml/m ²)	37 ± 6	122 ± 19	<0.001
RV-ESVi (ml/m ²)	75 ± 5	179 ± 42	0.002
RVEF (%)	51 ± 11	31 ± 6	0.03
PRF (%)	0	9 ± 7	0.03

Table 1

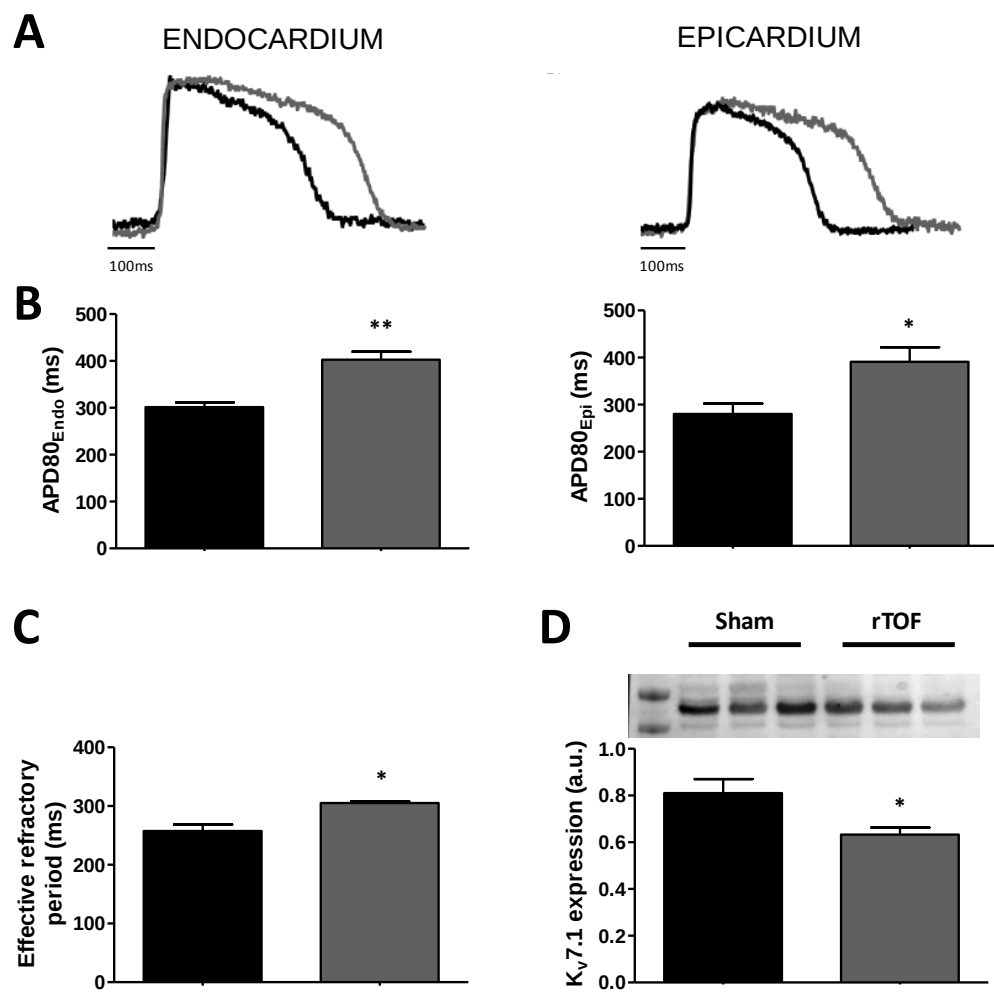


Figure 1

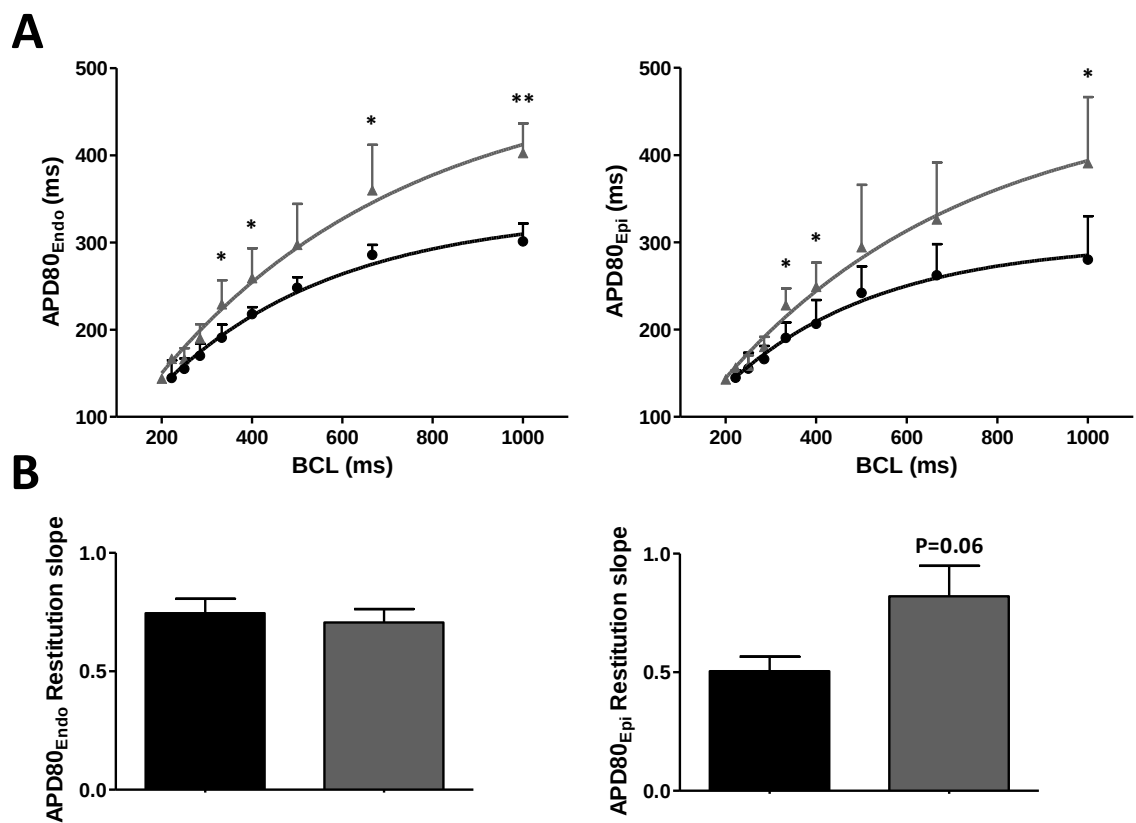
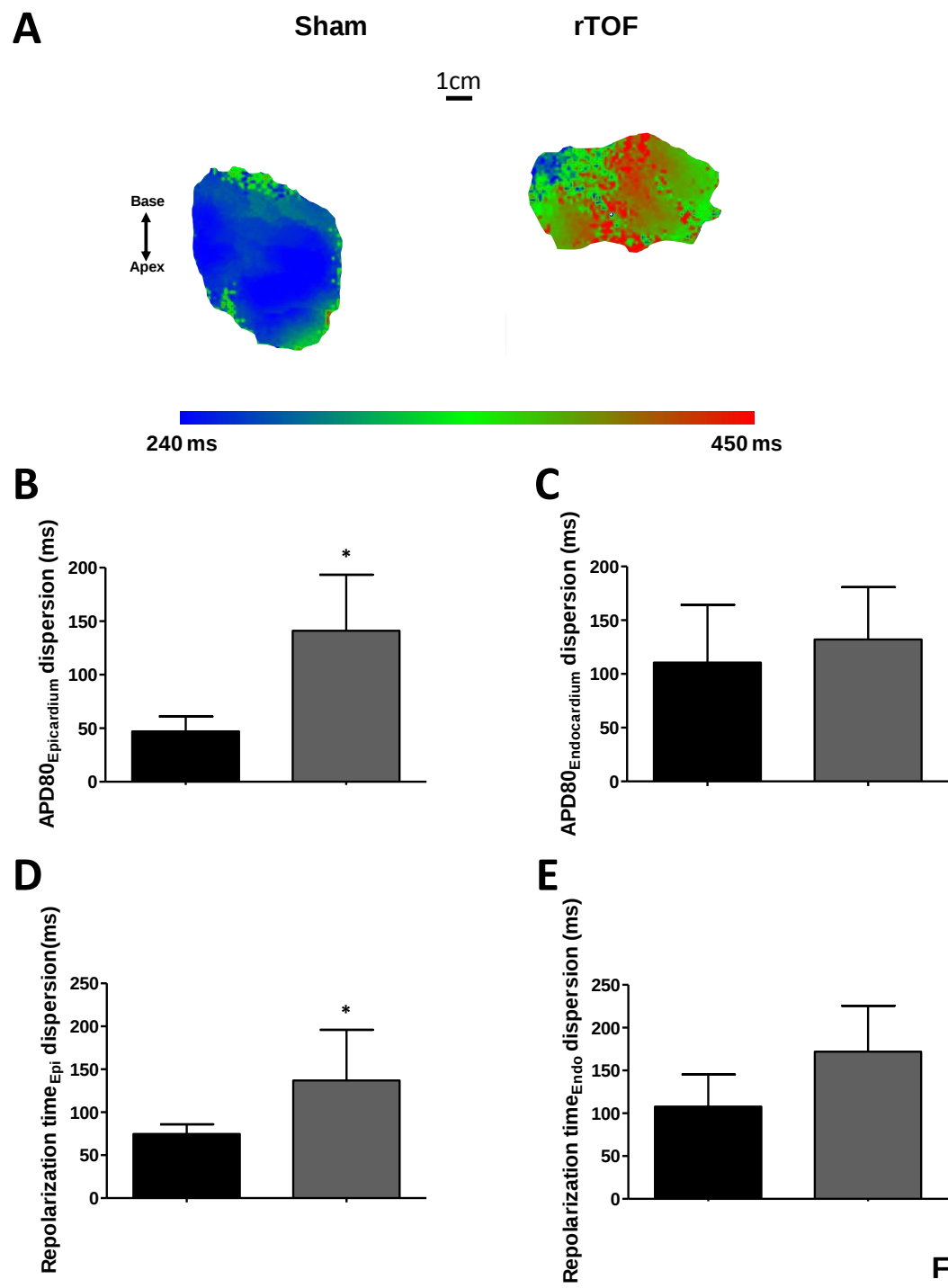


Figure 2



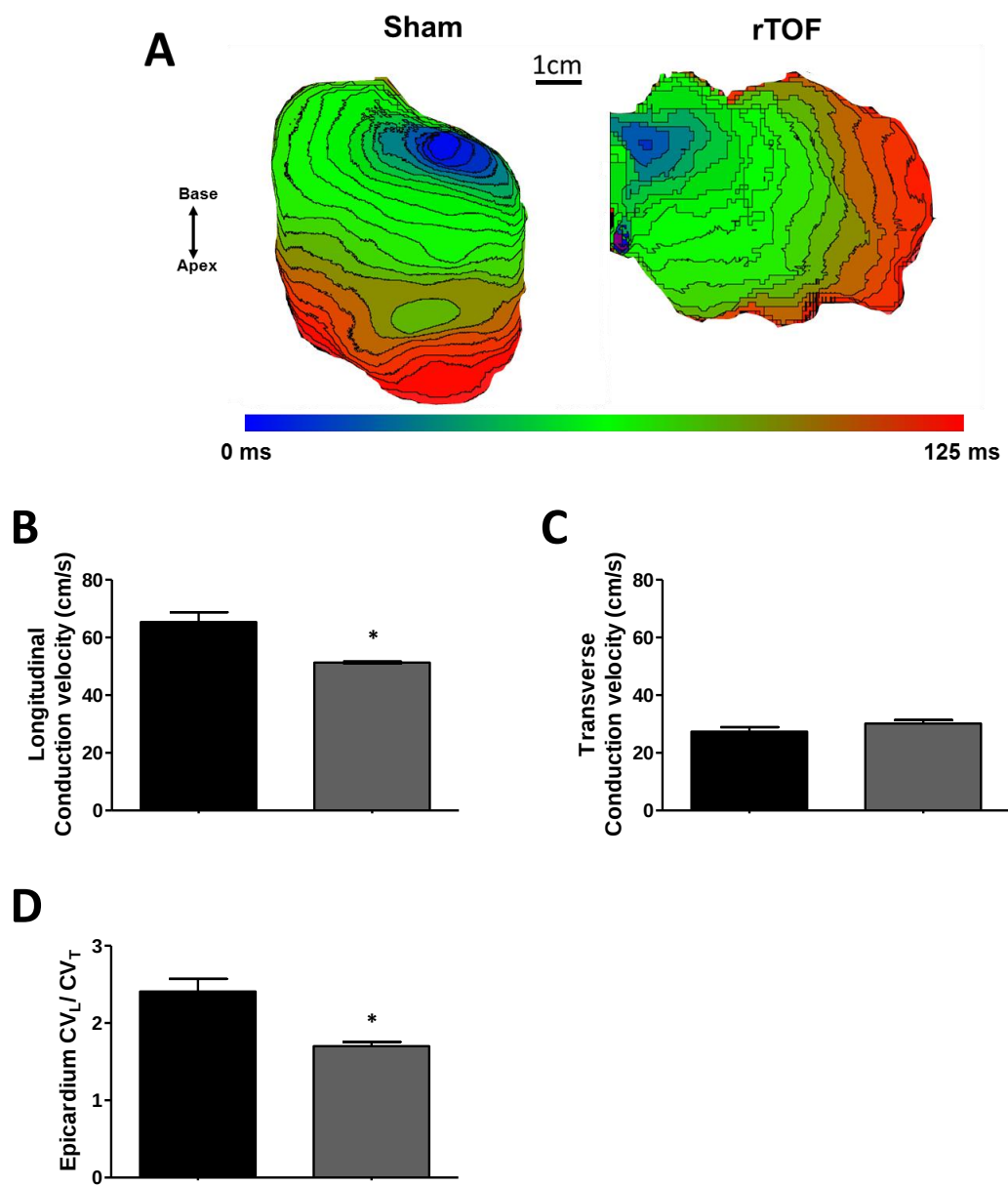


Figure 4

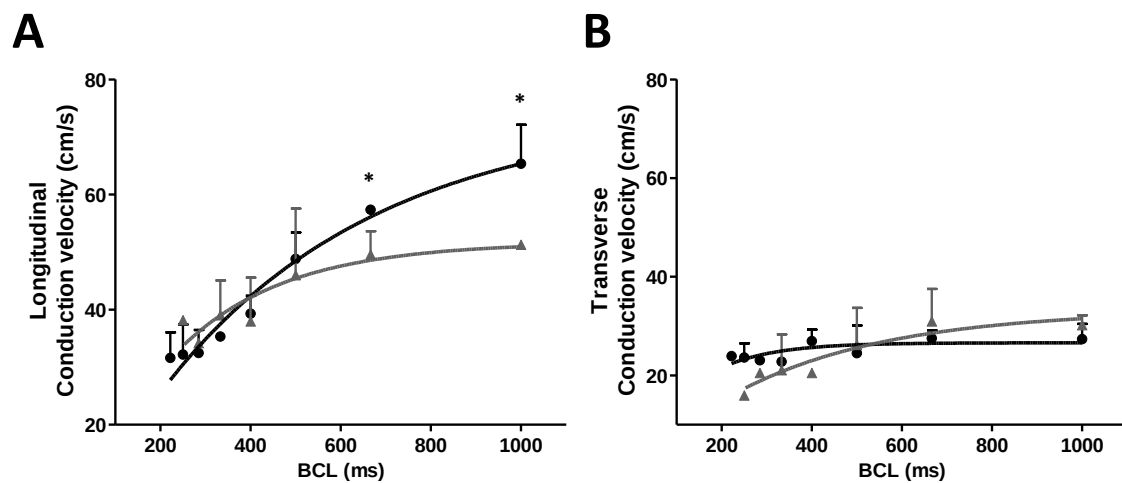


Figure 5

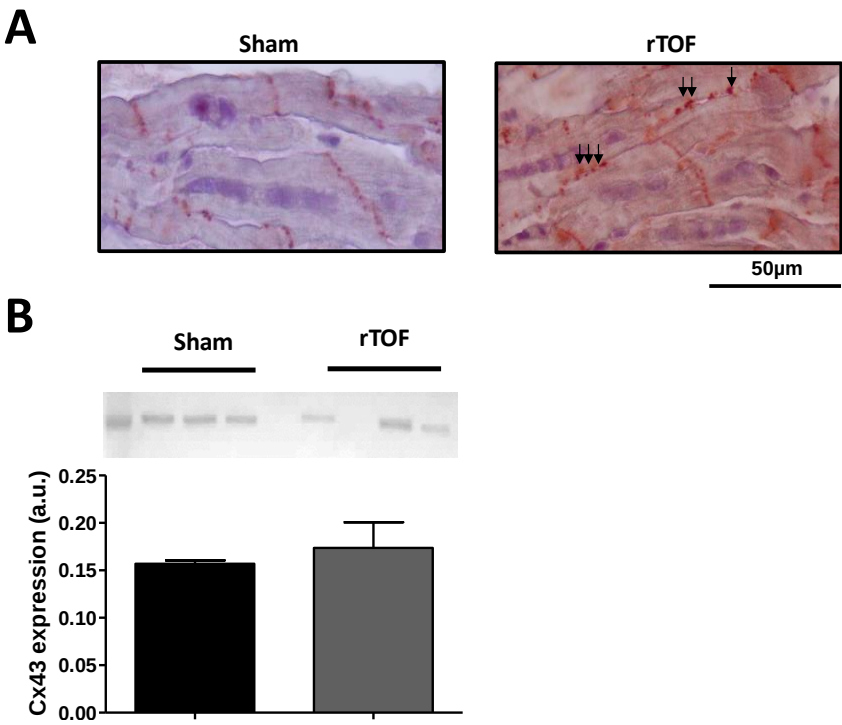


Figure 6

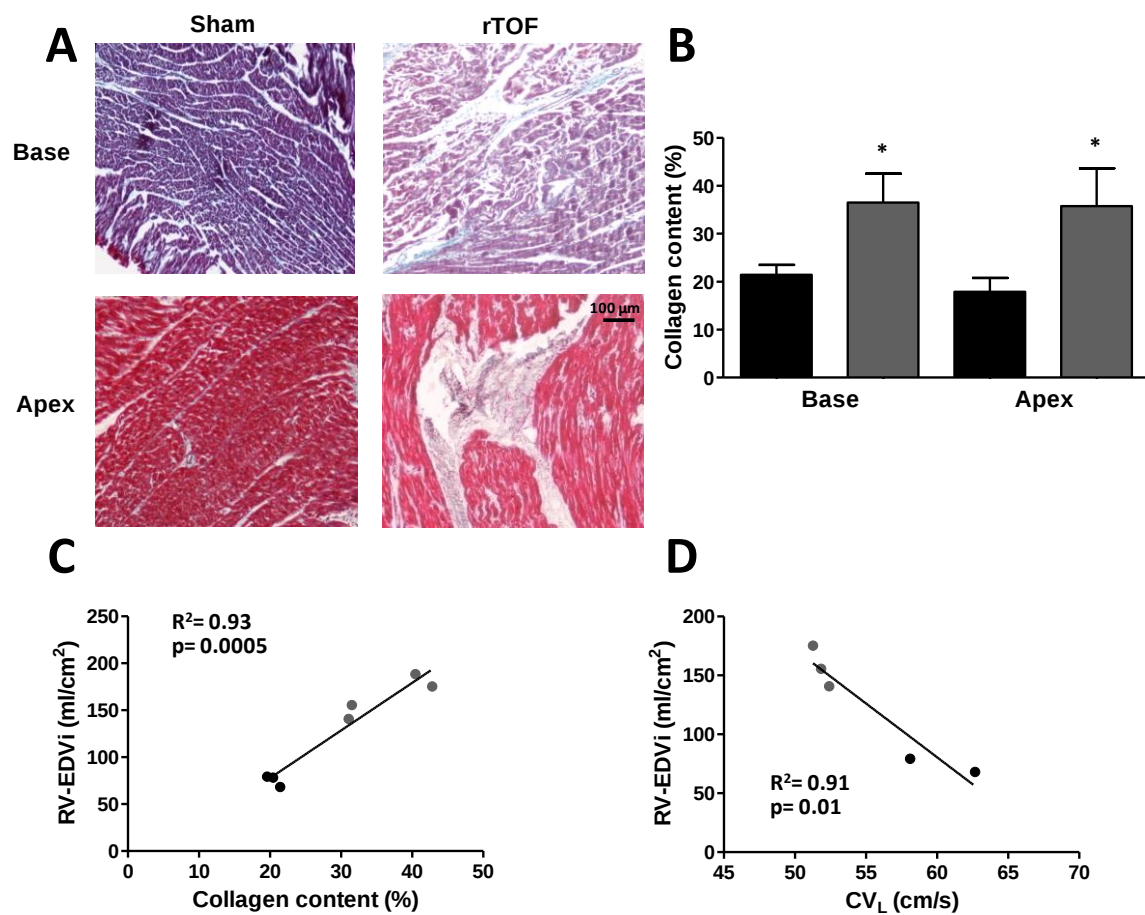


Figure 7

ONLINE SUPPLEMENTARY MATERIAL

Animal Model

Large White newborn piglets (<12 kg) were used in accordance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (NIH Publications No. 85-23, revised 1996) and with approval of the local ethical committee.

The animals were sedated with ketamine (10 mg/kg, intramuscularly (IM), Vibrac) and acepromazine (0.1 mg/kg, IM, Vetoquinol). Anesthesia was induced with sodium pentobarbital (5 mg/kg, intravenously (IV) Ceva) and maintained with isoflurane (2% in 100% oxygen, Vibrac) following endotracheal intubation.

A left thoracotomy between the fourth or fifth intercostal space was performed to access the heart. The pulmonary artery was clamped longitudinally, a 2 cm incision was made across the pulmonary annulus, and 2 pulmonary valve leaflets were excised. A polytetrafluorethylene patch was sewn across the pulmonary infundibulum and a loosely tied tape was passed around the artery (2 cm diameter).

Six animals underwent repaired surgery (rTOF) and five control animals were sham-operated (Sham) for which only the lateral thoracotomy was performed.

Animals were then studied at 23 ± 1 weeks post-surgery to assess cardiac function and electrophysiological remodeling.

Cardiac Magnetic Resonance

Upon return in the lab, animals were sedated and anaesthetized as explained above. A cardiac magnetic resonance (CMR) was performed using a Siemens Magnetom Avanto 1.5T MRI scanner (Erlangen, Germany). Pigs were placed in dorsal recumbancy and ECG leads placed after shaving and hair removal (Veet, Reckitt Benckiser, UK) and the telemetric vector electrocardiogram was used for gating of the Siemens CMR sequences. All images were taken during end-expiratory ventilation stop. Localizer views were followed by right-ventricular short-axis TrueFISP cine-image stacks (from the cardiac apex to the level of the pulmonary valve) under manual-breathhold. For pulmonary artery flow measurement phase-contrast MRI was carried out under manual-breathhold with the velocity encoding (VENC) set to 130 cm/s and the acquisition plane set parallel to and 1 cm above the pulmonary valve plane. CMR analysis was performed by a single investigator. Quantification of ventricular function was carried out using the Siemens syngo ARGUS Ventricular Function software package with manual drawing of a right ventricular endocardial contour and automatic LV segmentation from which end-systolic, end-diastolic, stroke volume and ejection fraction were determined. These values were indexed to body surface area (BSA) using the equation from Kelley et al (Kelley et al., 1973). The pulmonary regurgitation fraction was calculated using the Siemens syngo ARGUS Flow software package with the rephased images used to draw the analysis ROI and quantification calculated from the phase images. Pulmonary regurgitation fraction was calculated as the ratio of pulmonary retrograde to antegrade flow volume (expressed as a percentage).

After the MRI acquisition, pigs were euthanized by injection of sodium pentobarbital (10 mL from 200 mg/mL stock) and their hearts were rapidly excised. The aorta was cannulated and rinsed with an ice-cold cardioplegic solution containing (in mM): 110 NaCl, 1.2 CaCl₂, 16 KCl, 16 MgCl₂, 10 NaHCO₃, 9 Glucose supplemented with Heparin (2500 UI/L). The hearts and the LV were dissected and weighed.

Optical mapping of anterior LV wedges

The left anterior descending (LAD) coronary artery was cannulated and perfused with cardioplegic solution while suturing arterial leaks. Following suturing, the wedge was installed in a bath (37°C) and perfused at constant flow rate (20 mL/min) with modified Krebs-Henseleit solution containing (in mM): 130 NaCl, 4 KCl, 24 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄, 1 MgCl₂, 5.6 Glucose, and 1.8 CaCl₂. The solution was gassed with 95% O₂ and 5% CO₂ (pH 7.4) and the perfusate was maintained at 37°C. Motion artifacts

induced by contraction were suppressed using the electro-mechanical uncoupler blebbistatin (10 μ M, Enzo Life Sciences). Following staining with the voltage-sensitive dye di-4ANEPPS (10 μ M in bolus, Biotium), the LV wedge was excited by LED illumination at 530 nm (Cairn Research). Fluorescence emitted (optical signal) from both the epicardium and endocardium was filtered at 650 ± 50 nm and recorded simultaneously at 1 kHz with two MicamUltima CMOS camera (SciMedia USA Ltd) at 1 mm spatial resolution. Optical signals were filtered (3 x 3 spatial and 3 x 3 cubic filter) and background fluorescence was subtracted.

The wedge was paced from 1 Hz to 5 Hz by 0.5 Hz increments with a 5 ms pulse on the base of epicardium to investigate restitution properties. Action potential duration was measured at 80% of repolarization (APD_{80}) in 5 x 5 mm regions at the base, the mid-free wall, the apex of the anterior LV. The maximum slope of the APD_{80} restitution curves was determined after monoexponential curve fitting. APD_{80} dispersion was calculated as the difference between the 95th and the 5th percentile of the APD_{80} distribution across the LV. Repolarization time dispersion was calculated by subtracting minimal from maximal repolarization time over the whole field of view. The effective refractory period (ERP) was measured by an S1-S2 protocol, consisting of continuous 10 S1 stimuli at 1000 ms cycle length followed by an additional S2 stimulus at gradually decreasing coupling intervals. The last coupling interval that produced an action potential was defined as the ERP. Longitudinal conduction velocity (CV_L) and transverse conduction velocity (CV_T), were measured along the directions of fastest and slowest propagation velocity from the stimulus point.

Histology

Tissue samples (1.5 x 1.5 cm) were collected from the apex and the base of the LV and fixed in 4% paraformaldehyde (Sham, rTOF N=4). Samples were immersed in ethanol at increasing concentrations (70%, 90%, 100%) for dehydration, rinsed with toluene, embedded in paraffin and stored at -20°C until use. Transmural sections (8 μ m) were stained with Masson's Trichrome (HMS70, Thermo Scientific). Slides were examined at 10X magnification on a Nikon Eclipse 80i equipped with a CDD camera. Analysis was performed blindly on 3 sections per animal by color thresholding using ImageJ software. Blue-stained areas corresponding to collagen were expressed as a percentage of the section total area. Perivascular and epicardial collagen staining were excluded from the quantification.

Immunohistochemistry

After deparaffinization and dehydration, the transmural sections were treated with 3% H_2O_2 at -20°C for 10 minutes to quench endogenous peroxidase activity. Then all sections were treated at 100°C with sodium citrate buffer, pH 6 (Dako) for 20 minutes for antigen retrieval. After blocking endogene avidine and biotine (Dako), sections were incubated with 10% donkey serum for 10 minutes to block nonspecific reactions. To finish, sections were incubated with anti-connexin 43 antibodies (mouse polyclonal, 1:250, Millipore) overnight at 4°C. After rinsing with Phosphate Buffer Saline, sections were incubated with biotinylated secondary antibodies and the conjugated enzyme streptavidine peroxidase. Immunoreactive cells were observed with the chromogene 3 Amino 9 ethyl-carbazole and then counterstained with Hematoxylin. Slides were examined at a 40X magnification on a Nikon Eclipse 80i equipped with a CDD camera.

Western Blots

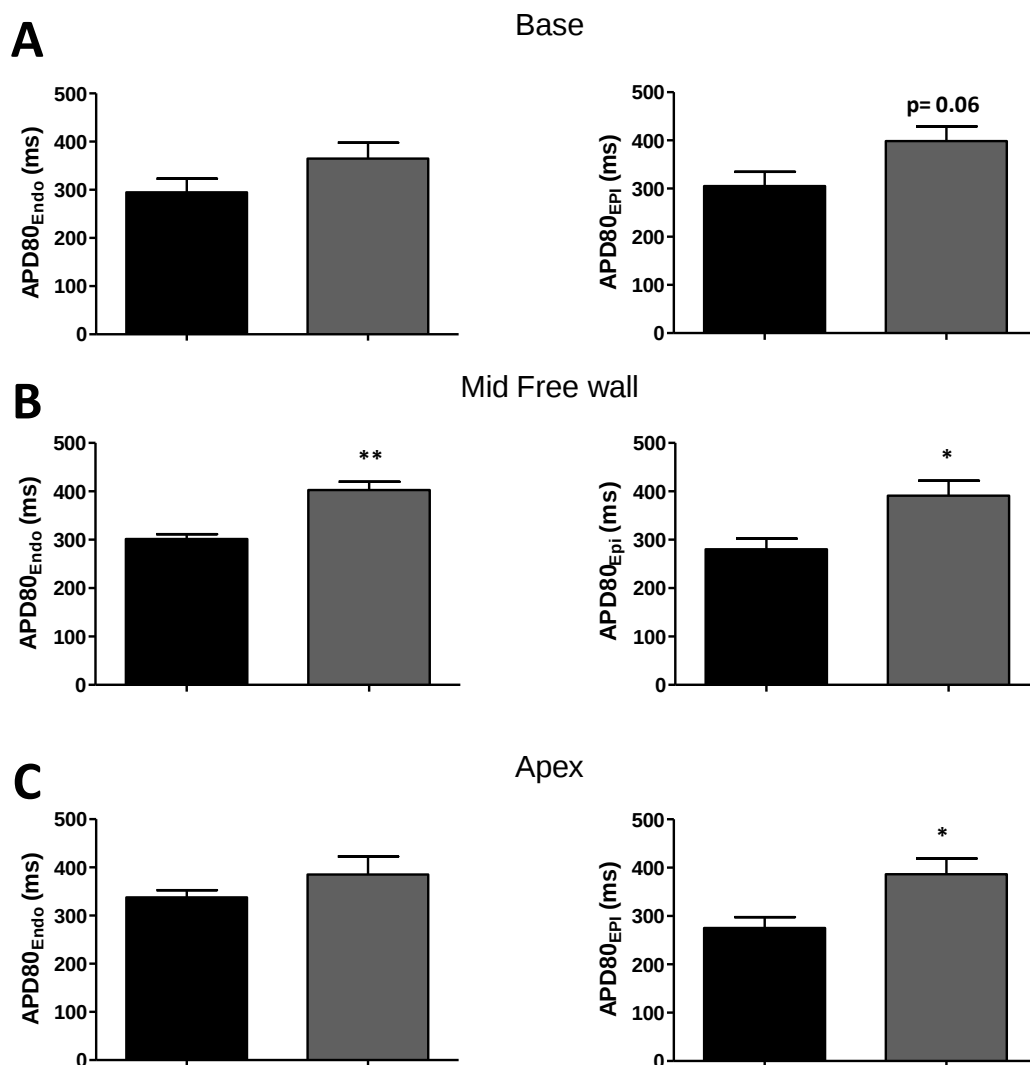
Epicardial and endocardial tissue layers were dissected from LV free wall and snap frozen in liquid nitrogen. All samples were stored at -80°C until protein extraction. Tissue sample were homogenized and sonicated in RIPA buffer (Sigma Aldrich) completed with proteases and phosphatases inhibitor cocktails (Sigma Aldrich). Proteins were extracted by centrifugation at 12 000 g for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined by bicinchonic acid assay (Thermo Scientific) and before separation (50 μ g) on 12% acrylamide gels (TGX Stain-Free precast gels, Bio-Rad) under reducing conditions. Following semi-dry transfer (Trans-blot Turbo, Bio-Rad), PVDF membranes were

incubated overnight at 4°C with the appropriate primary antibodies (Connexin-43, 1:500, Sigma-Aldrich; K_v7.1, 1:400, Alomone) followed by incubation with secondary antibodies (Goat anti-rabbit, 1:2000, Bio-Rad). Total hybridized proteins were imaged under UV light and Connexin-43 and K_v7.1 specific signals were revealed by enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific). Western blot quantification was performed using ImageJ (NIH). Specific immunosignals were normalized to the total protein content of each lane.

Data analysis

Data are presented as mean $\pm$ SD. Differences were determined using an unpaired or paired Student test or their non-parametric equivalent or by linear regression analysis using GraphPad Prism software. A p-value of $P < 0.05$ was considered significant.

SUPPLEMENTAL FIGURES



Supplemental Figure 1

Supplemental Figure 1 – Regional action potential duration in Sham and rTOF LVs. Epicardial and endocardial action potential duration (APD₈₀) was measured in the base (A), mid-free wall (B), and apex (C) of LVs stimulated at 1 Hz. APD₈₀ was increased in the mid-free wall epicardium and endocardium as well as in the epicardium apex. * P < 0.05, ** P < 0.01 Sham n=5, rTOF n=6.

SUPPLEMENTAL REFERENCES

1. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM, Anderson CR. Body surface area of female swine. J Anim Sci 1973;36(5):927-930.

IV/ Résultats supplémentaires

1. Gradients inter-ventriculaires d'APD

A partir des données obtenues au cours des expérimentations réalisées en cartographie optique montrant l'hétérogénéité inter-ventriculaire en EPI (**Figure 88A**) et en ENDO (**Figure 88B**), nous avons quantifié les gradients inter-ventriculaires épicaudiques (**Figure 88C**) et endocardiques (**Figure 88D**). Les gradients inter-ventriculaires EPI et ENDO sont exprimés en pourcentage des APD_{80} en VD postérieur, enregistrés au niveau des faces EPI et ENDO du VD postérieur, VD antérieur et VG antérieur après une stimulation à la fréquence de 1 Hz. Il en résulte une inversion significative du gradient ventriculaire et inter-ventriculaire EPI de l' APD_{80} au niveau du VD antérieur et du VG antérieur. Les gradients inter-ventriculaires ENDO de l' APD_{80} ne sont pas inversés sauf au niveau du VG antérieur.

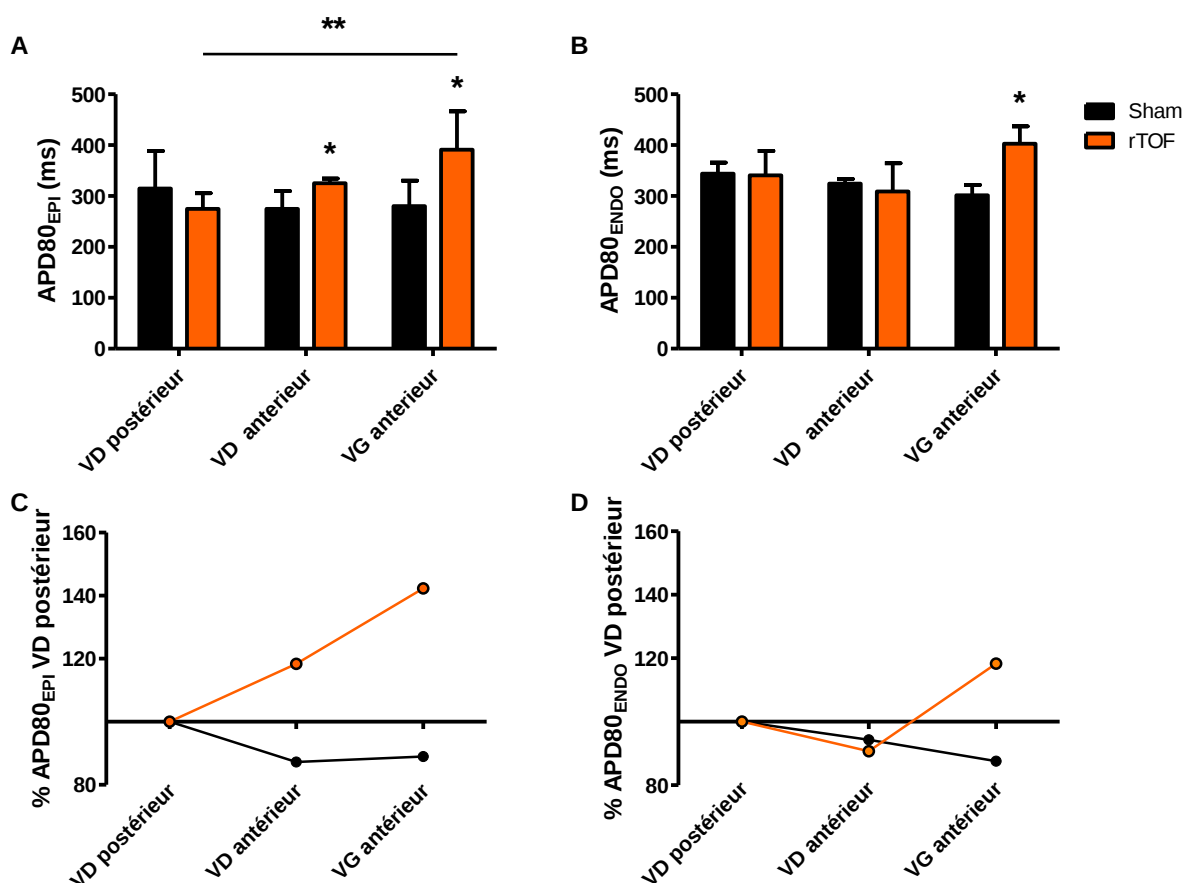


Figure 88. Hétérogénéité et gradients inter-ventriculaires de l' APD_{80} dans les cœurs de cochons sham et rTOF. L'hétérogénéité inter-ventriculaire des APD_{80} en EPI (**A**) et en ENDO (**B**) est représentée chez les animaux sham et rTOF. Lors d'une stimulation épicaudique de 1 Hz, le gradient inter-ventriculaire de l' APD_{80} est inversé au niveau de l'EPI du VD antérieur et du VG antérieur chez les animaux rTOF par rapport aux animaux sham (**C**). Par contre, le gradient inter-ventriculaire de l' APD_{80} est conservé entre les deux groupes d'animaux après une stimulation endocardique de 1 Hz au niveau de l'ENDO mis à part au sein du VG antérieur (**D**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (sham versus rTOF), $N = 3-4$ cœurs sham et $N = 4$ cœurs rTOF.

2. Immunomarquages

Afin de compléter l'étude réalisée sur les animaux rTOF, des immunomarquages ont été réalisés sur des coupes de tissu et sur des cellules fraîchement dissociées provenant d'un nombre limité de cœurs de cochons sham et rTOF.

Nous avons souhaité mettre en évidence deux protéines : le canal $K_v4.3$ et la Cx43 participant respectivement au phénomène de repolarisation et de conduction de l'activité électrique cardiaque.

a) *Le canal $K_v4.3$*

Le canal $K_v4.3$ semble être exprimé dans les différents types de cardiomyocytes (VD antérieur, VG antérieur) dissociés sur les couches sub-endocardiques des cœurs de cochons sham et rTOF (**Figure 89A**). La quantification de l'intensité de fluorescence sur les cellules isolées montre un marquage plus important dans le groupe des cellules VD issues des cœurs rTOF par rapport aux cœurs sham (**Figure 89B**). Cependant, ces résultats doivent être pris avec précaution car ils ont été réalisés sur deux animaux sham et rTOF.

Il y aurait donc une tendance à l'augmentation de l'expression des canaux $K_v4.3$ dans les couches sub-endocardiques du VD antérieur des cochons rTOF.

L'immunomarquage de la protéine $K_v4.3$ est observé le long des invaginations du sarcolemme témoignant ainsi d'une localisation au niveau du réseau de tubules T. Il semblerait que la localisation de la protéine $K_v4.3$ soit identique chez les cochons sham et rTOF pour les différents groupes cellulaires étudiés (**Figure 89A**).

Le canal $K_v4.3$ est responsable du courant I_{to} qui participe à la phase de repolarisation précoce du PA des cardiomyocytes ventriculaires. La représentation des APDs mesurés à 20% de la repolarisation totale permet d'apprécier le rôle du courant I_{to} au court du processus de repolarisation. Dans notre étude, l'enregistrement des APD₂₀ ENDO effectués au milieu de la paroi libre du VD antérieur montre un prolongement des APD₂₀ chez les animaux sham ($234,2 \pm 37,50$ ms) par rapport aux animaux rTOF ($181,96 \pm 32,65$ ms) (**Figure 89C**).

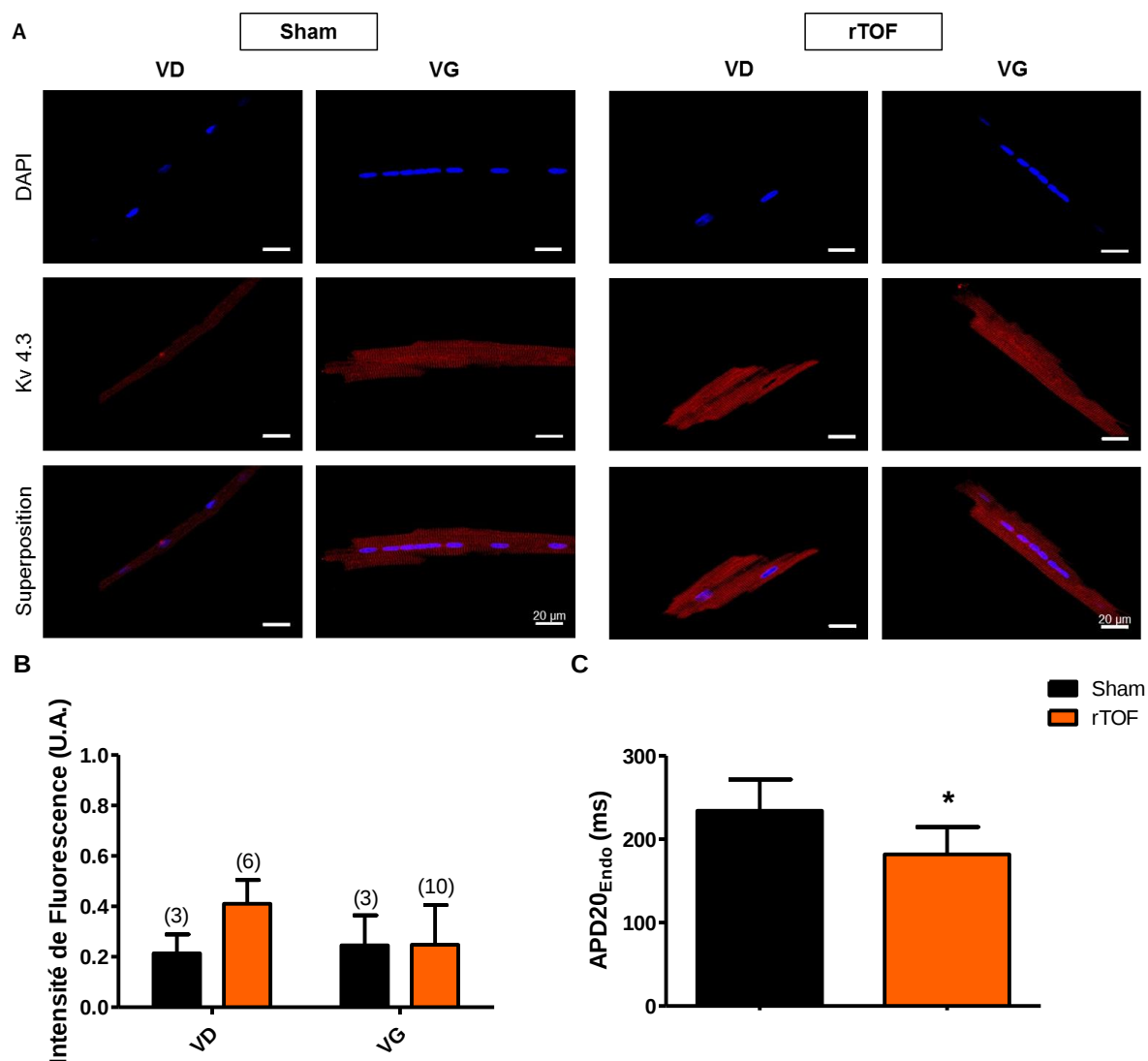


Figure 89. Immunomarkage de la protéine $K_v4.3$ et APD_{20} sub-endocardique. Mise en évidence en microscopie confocale de l'immunomarkage du canal $K_v4.3$ (rouge) sur des cardiomyocytes provenant des couches ENDO du VD antérieur et VG antérieur issues des cœurs de cochons sham et rTOF (**A**). Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). Les canaux $K_v4.3$ sont présents au niveau de la membrane plasmique et plus précisément au niveau des tubules T des différents cardiomyocytes. L'intensité de fluorescence (**B**) est mesurée sur chaque groupe de cellules issus des cœurs sham (noir) et rTOF (orange). Les chiffres entre parenthèses correspondent aux nombre de cellules analysées sur une totalité de $N = 2$ cœurs sham et $N = 2$ cœurs rTOF. Représentation des APD_{20} mesurés au niveau de la paroi libre du VD antérieur ENDO (**C**). * $P < 0,05$ (sham versus rTOF), $N = 4$ cœurs sham et $N = 6$ cœurs rTOF.

b) La Connexine 43

Les immunomarquages de la Cx43 et de la N-cadhérine ont été observés sur des coupes de tissu cardiaque provenant du VD antérieur des cochons sham et rTOF (**Figure 90**). Les protéines Cx43 et N-cadhérine sont marquées respectivement en vert et en rouge. La N-cadhérine est une protéine composant les jonctions adhérentes et permet de localiser les disques intercalaires au sein du tissu.

Les protéines Cx43 et N-cadhérine sont colocalisées préférentiellement au niveau des disques intercalaires (flèches bleues) des cardiomyocytes provenant du VD antérieur sham alors qu'elles sont présentes au niveau de la membrane latérale (flèches orange) des cellules du VD antérieur rTOF.

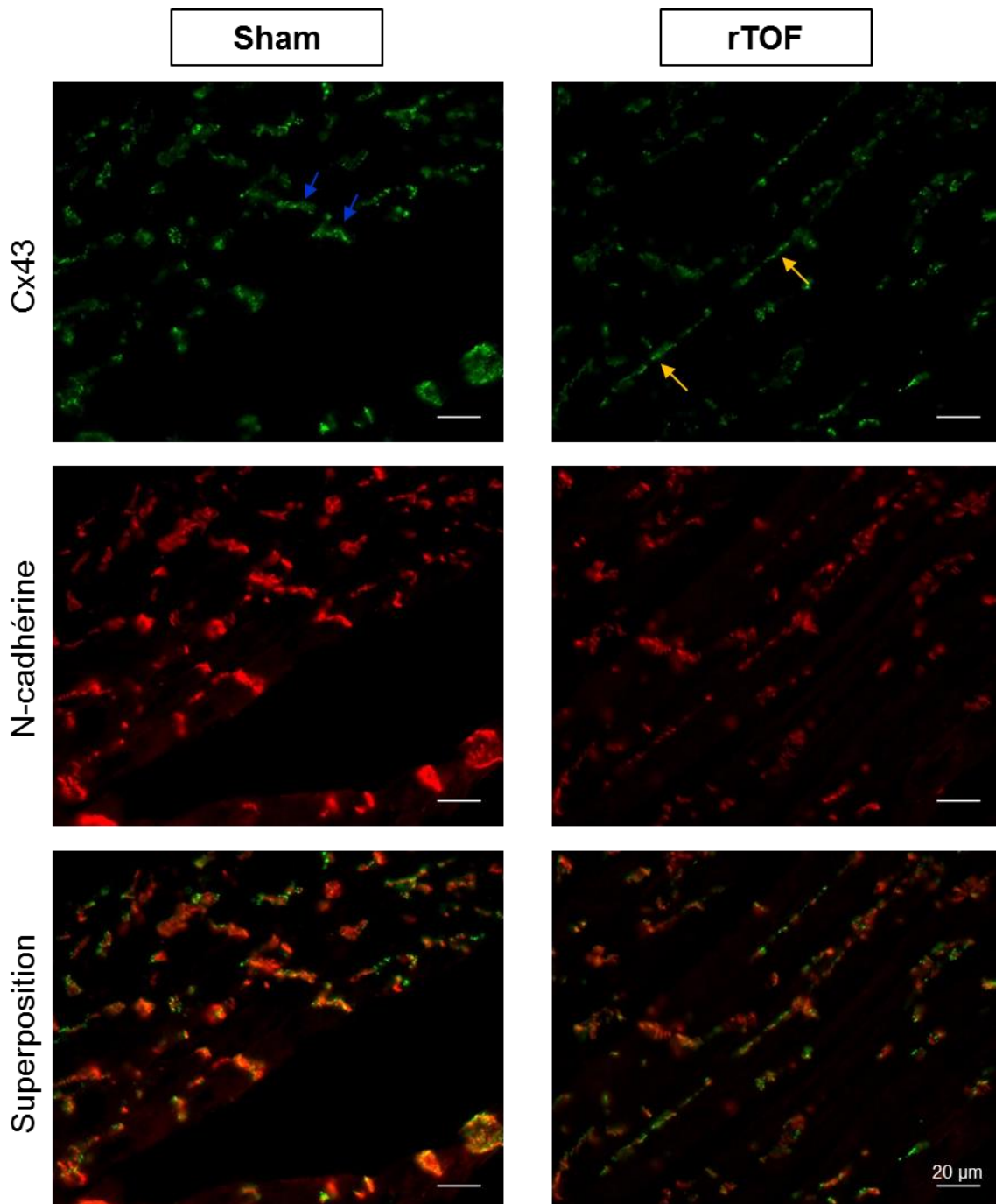


Figure 90. Immunomarquages de la Cx43 et de la N-cadhérine. Les immunomarquages des Cx43 (vert) et N-cadhérine (rouge) sont réalisés sur des coupes de tissus provenant du VD antérieur de cœurs de cochons sham et rTOF. Au sein du VD antérieur des animaux sham, la Cx43 est colocalisée avec la N-cadhérine au niveau des disques intercalaires (flèches bleues). Au niveau du VD antérieur des animaux rTOF, les deux protéines sont colocalisées sur la membrane latérale (flèches orange) des cardiomyocytes.

3. Organisation du réseau de tubules T

Un remodelage de l'organisation du réseau de tubules T est observé chez les animaux rTOF dans les cellules RVOT ENDO. Les tubules T apparaissent irrégulièrement répartis et moins organisés dans les cellules du RVOT ENDO des animaux rTOF en comparaison aux cellules RVOT ENDO sham (**Figure 91A**). Cette observation est confirmée par la présence d'une densité de puissance de transformée de Fourier (FFT) significativement plus faible de 85% dans le groupe RVOT rTOF par rapport au groupe RVOT sham (**Figure 91C**). Concernant le groupe de cardiomyocytes du VD ENDO, la densité de puissance FFT a tendance à être diminuée dans le groupe rTOF comparé au groupe sham. De plus, la densité de puissance FFT est significativement plus faible de 86% dans le groupe RVOT rTOF que dans le groupe VD sham.

Toutefois l'espacement des tubules T reste identique dans les trois groupes cellulaires entre les animaux sham et rTOF avec une valeur moyenne de 1,8 μm (**Figure 91B**).

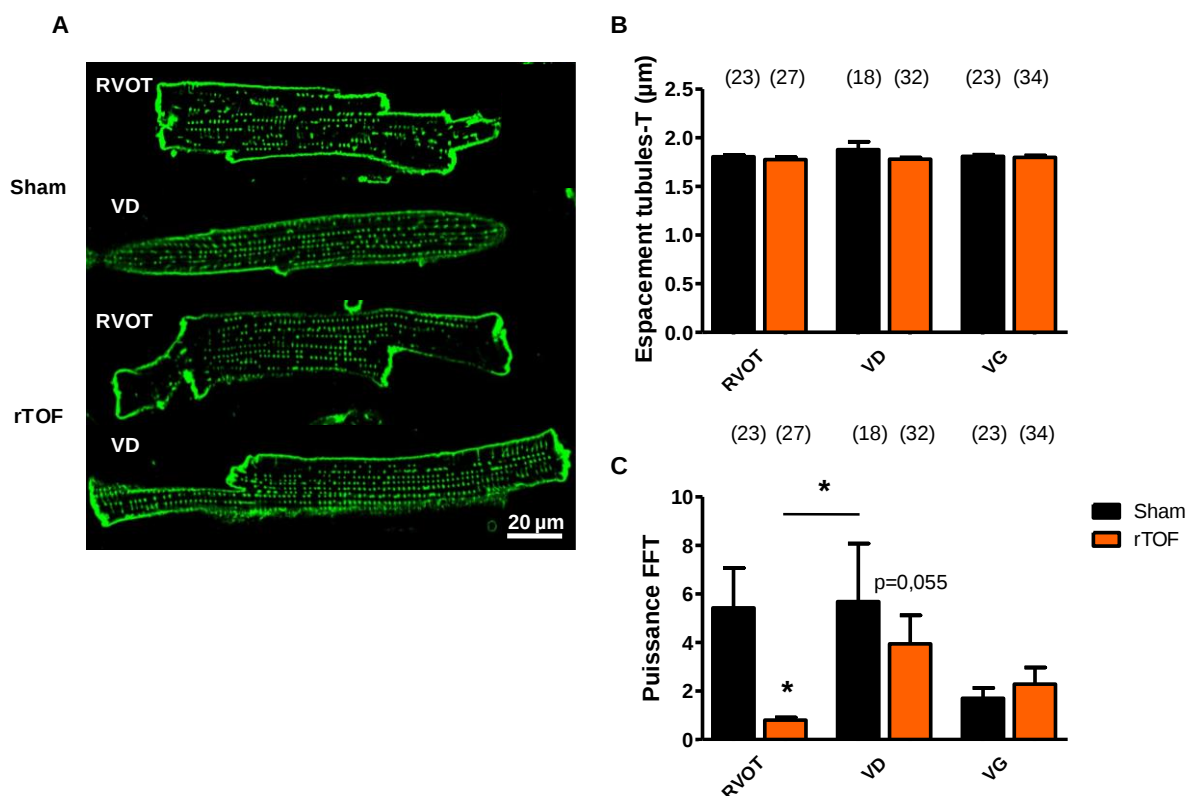


Figure 91. Organisation du réseau de tubules T dans les cardiomyocytes. Représentation d'images obtenues en microscopie confocale de cardiomyocytes du RVOT et du VD isolés des couches ENDO de cœurs sham et rTOF (**A**). Notons la présence de striations irrégulières entre les cellules du RVOT sham et RVOT rTOF ainsi qu'entre les cellules RVOT rTOF et VD sham. L'espacement entre les tubules T est similaire au sein des différents groupes cellulaires et entre les deux groupes d'animaux (**B**). La densité de puissance de la transformée de Fourier (FFT) est significativement diminuée dans les cellules RVOT rTOF en comparaison avec les cellules RVOT sham. Elle est également statistiquement plus faible pour les cellules RVOT rTOF par rapport aux cellules VD sham (**C**). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ (sham versus rTOF). Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules analysées sur une totalité de $N = 3$ cœurs sham et $N = 4$ cœurs rTOF.

V/ Discussion des résultats

Une hétérogénéité des propriétés de repolarisation est présente au sein du myocarde en condition physiologique de part l'existence d'un gradient apico-basal, antéro-postérieur et inter-ventriculaire (*Arteyeva et al., 2015; Volders et al., 1999*). Cependant, une intensification de la disparité de ces gradients augmente la probabilité d'apparition d'arythmies (*Antzelevitch, 2007*).

Au sein des cœurs rTOF, un remodelage progressif lié à une hétérogénéité des propriétés de repolarisation est observé.

Sur le plan électrophysiologique, rappelons que les APD₈₀ mesurés en milieu de paroi libre épicaudique du VD restent inchangés chez les animaux rTOF en comparaison avec les animaux sham. Cependant, une analyse régionalisée du VD révèle une augmentation significative de l'APD₈₀ au niveau de l'épicarde du VD antérieur rTOF ($325,26 \pm 9,01$ ms) en comparaison avec le VD antérieur sham ($274,71 \pm 35,08$ ms). Néanmoins cette augmentation de l'APD₈₀ n'est pas observée au niveau de l'épicarde du VD postérieur des animaux rTOF. Concernant le VG antérieur, l'APD₈₀ épicaudique est prolongé chez les cochons rTOF ($390,97 \pm 75,64$ ms) par rapport aux cochons sham ($280,21 \pm 49,83$ ms). Ce remodelage conduit à la formation d'un gradient antéro-postérieur chez les animaux rTOF avec une augmentation graduelle de l'APD₈₀ du VD postérieur au VG antérieur au niveau épicaudique. Côté sub-endocardique, l'APD₈₀ mesuré au niveau de la paroi libre du VG antérieur, est significativement prolongé (sham $301,39 \pm 20,51$ ms vs rTOF $402,77 \pm 33,95$ ms) alors qu'il est inchangé dans les différentes régions du VD. Il en résulte la préservation d'un gradient transmural d'APD₈₀ pour le VD postérieur et le VG antérieur ainsi qu'une inversion de ce dernier pour le VD antérieur. Certaines études effectuées sur des cohortes de patients opérés de la tétralogie de Fallot témoignent d'une hétérogénéité globale de la repolarisation comme celle présente dans notre modèle animal. Helbing et ses collaborateurs ont montré sur de jeunes adolescents rTOF, une dispersion de l'onde QRS et de l'intervalle QT traduisant une plus grande dispersion de la repolarisation (*Helbing et al., 2002*).

Parmi les altérations des courants ioniques associées aux processus d'hypertrophie et de dilatation rencontrés dans certaines pathologies cardiaques, la réduction du courant I_{to} s'avère la plus précoce et la plus constante. En condition physiologique, les myocytes ventriculaires présentent une hétérogénéité dans la densité de courant I_{to}, responsable du gradient transmural au sein des deux ventricules (*Antzelevitch et al., 1991; Konarzewska et*

al., 1995). Ce courant I_{to} ventriculaire résulte en majeure partie de l'activation de canaux $K_v4.3$ chez l'homme et le chien, et des canaux $K_v4.3$ et $K_v4.2$ (ces derniers étant particulièrement abondants dans l'épicaarde) chez le rat (*Dixon et al.*, 1996).

Dans notre étude, l'immunomarquage réalisé pour le canal $K_v4.3$ apporte plusieurs informations complémentaires sur le remodelage pro-arythmique des ventricules dans la tétralogie de Fallot réparée. Une première information purement descriptive, révèle la présence de cette protéine dans l'espèce porcine. Cependant, dans la littérature, la présence du canal $K_v4.3$ au sein des cœurs de cochons reste controversée. En effet, Li et ses collaborateurs ont révélé l'absence du courant I_{to1} et de la protéine $K_v4.3$ par western-blot dans les cardiomyocytes ventriculaires de cochon (*Li et al.*, 2003) alors que Lacroix et son équipe ont démontré l'inverse (*Lacroix et al.*, 2002).

Sur le plan fonctionnel, le canal $K_v4.3$ responsable du courant I_{to1} , est impliqué dans la phase de repolarisation précoce (phase 1), et participe à l'initiation de la phase plateau (phase 2) du PA des cardiomyocytes ventriculaires provenant surtout des couches sub-épicaardiques. Lors de pathologies cardiaques, la réduction de la densité de courant I_{to} a été rapportée, contribuant ainsi à l'augmentation de la durée du PA (*Huo et al.*, 2014). De plus, de nombreuses études ont décrit une diminution de l'expression de ce canal dans un contexte pathologique comme l'hypertrophie ventriculaire, l'infarctus, et l'IC (*Benoist et al.*, 2011; *Kaab et al.*, 1998).

Etonnamment, dans notre modèle animal ce canal semble être plus exprimé au niveau de l'endocarde du VD antérieur des animaux rTOF par rapport aux animaux sham. Néanmoins, nous n'avons pas réalisé d'enregistrements de densité de courant I_{to} permettant de révéler la fonctionnalité des canaux $K_v4.3$ observés.

Cependant, l'observation faite à partir de l'immunomarquage de la protéine $K_v4.3$ peut être associée aux données obtenues en cartographie optique. En effet, le courant I_{to} contribue à la durée du PA à différents temps de repolarisation (APD_{20-60}) (*Workman et al.*, 2012). Ainsi, la diminution des APD_{20} mesurés au niveau du sub-endocarde du VD antérieur des animaux rTOF peut être liée à l'augmentation du nombre de canaux $K_v4.3$ dans cette région.

Au sujet des propriétés de conduction de l'activité électrique, nous avons montré que la perturbation des VC contribuait au remodelage pro-arythmique au sein des ventricules rTOF. Les patients développant des cardiomyopathies arythmogènes, présentent un remodelage des jonctions gap qui se traduit par une altération des niveaux d'expression et de distribution de la Cx43 (*Severs et al.*, 2008). Dans notre étude, nous retrouvons une modification du niveau d'expression de la Cx43 qui est plus faible dans le VD antérieur des

animaux rTOF en comparaison aux animaux sham rappelant ainsi le phénotype des patients TOF (Kolcz *et al.*, 2005).

De plus, la Cx43 est localisée au niveau de la membrane latérale des cardiomyocytes du VD antérieur et VG antérieur plutôt que les disques intercalaires. Ce phénomène de latéralisation de la Cx43 retrouvé par exemple dans l'IC, est responsable de la diminution de la V_L (Akar *et al.*, 2004).

La distribution hétérogène des jonctions gap associée à une réduction du nombre de Cx43 contribueraient à la création d'un substrat arythmogène dans le modèle porcin rTOF.

Les cardiomyocytes ventriculaires adultes possèdent un réseau développé et complexe de tubules T qui permet une propagation rapide de l'onde de dépolarisation à l'intérieur de la cellule (Brette and Orchard, 2003). L'analyse des images obtenues en microscopie confocale, suggère une altération modérée du réseau de tubules T au sein des cardiomyocytes du RVOT rTOF. Des modifications morphologiques de ces structures tubulaires sont observées également dans les pathologies cardiaques. Dans un modèle d'IC induite par tachycardie chez le chien, il a été montré une diminution d'environ de 24% de la densité du réseau de tubules T (He *et al.*, 2001). Dans une autre pathologie cardiaque, l'infarctus du myocarde, Louch et ses collaborateurs ont démontré une désorganisation du réseau de tubules T dans les cellules isolées de ventricules de souris une semaine post-infarctus (Louch *et al.*, 2006).

Les striations des tubules T apparaissent moins régulières au sein du RVOT rTOF avec la présence de régions dépourvues de tubules T et il semblerait qu'une tendance à la désorganisation du réseau de tubules T soit présente dans les cellules VD rTOF.

Comme il a été démontré dans la section sur les tubules transverses, les canaux potassiques fonctionnels mais aussi les canaux calciques de type L, les échangeurs NCX, les pompes Na^+/K^+ sont localisés au niveau des tubules T des cardiomyocytes ventriculaires adultes (Brette and Orchard, 2007; Komukai *et al.*, 2002). De ce fait, l'altération de l'architecture du sarcolemme dans les cellules du VD rTOF pourrait affecter l'homéostasie calcique et contribuer à la génération d'arythmies (Hong *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2006). Le remodelage de la membrane plasmique observé dans le VD des animaux rTOF n'affecte pas les cardiomyocytes fraîchement isolés du VG antérieur. Les modifications électrophysiologiques observées dans le VG rTOF ne seraient donc pas liées à la modification de la structure membranaire.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans une première partie, nous avons essayé de comprendre en quoi le phénotype de la région de l'infundibulum pulmonaire est spécifique d'un point de vue électrophysiologique et structurel, et comment ce phénotype pourrait faciliter le déclenchement et le maintien d'arythmies dans cette région connue pour être arythmogène (les TVIs, le syndrome de Brugada, et la DAVD).

Le RVOT sain se caractérise par des APDs sub-épicaux courts à 20% et 80% de repolarisation par rapport au reste de la cavité ventriculaire droite, en lien à l'échelle moléculaire avec un niveau d'ARNm élevé des canaux potassiques $K_v4.3$ et $K_v11.1$.

Les propriétés de conduction au sein du VD sont hétérogènes de par la présence d'une conduction lente de l'influx électrique au sein du RVOT ainsi que de la présence d'une ligne de ralentissement de conduction. Au niveau moléculaire, un faible niveau d'expression des ARNm codant pour les canaux $Na_v1.5$ et les protéines Cx43 contribue sûrement à ce ralentissement. De plus, nous avons également montré une altération de l'adressage de la protéine Cx43 à la membrane.

Le phénotype du RVOT sain décrit durant cette étude pourrait être lié à l'origine embryologique différente de cette région ainsi qu'à sa maturation tardive sur le plan électrique.

Sur le plan structurel, les fibres myocardiques du RVOT présentent un changement d'orientation transmural abrupt par rapport aux fibres myocardiques du reste du VD conférant une activation spécifique à l'infundibulum pulmonaire. D'autre part, nous avons relevé la présence d'importants infiltrats de collagène mais également adipocytaires qui sont autant de mécanismes pouvant ralentir localement la VC de l'onde électrique.

Cependant, ces travaux soulèvent une question importante sur le phénotype du syndrome de Brugada et de la DAVD : « Est-ce que la présence d'une fibrose anormale et d'une infiltration adipeuse au sein du RVOT sont spécifiques de ces pathologies ? ».

D'après les résultats obtenus au sein du RVOT sain, les paramètres structuraux ne seraient pas typiques de ces maladies. L'hypothèse serait que les modifications électrophysiologiques et structurelles ne seraient pas le mécanisme arythmogène principal mais constitueraient un substrat arythmogène pouvant évoluer selon certains facteurs environnementaux ou génétiques. De ce fait, il resterait à approfondir la piste de la « gâchette » responsable des

arythmies. Il serait donc intéressant d'étudier les éléments déclencheurs d'arythmies à l'échelle cellulaire par des études pharmacologiques ciblant des voies de signalisation.

Le RVOT est le siège d'une reconstruction anatomique néonatale dans la tétralogie de Fallot. Dans la littérature, la majorité des études sur la réparation de la TOF est menée sur des cohortes de patients avec pour principaux objectifs, l'analyse des troubles du rythme et de l'hémodynamique cardiaque.

Notre étude apporte quant à elle, de nouvelles connaissances sur la présence et la nature d'un remodelage sur le plan électrique et structurel à l'échelle tissulaire, protéique et moléculaire.

Ce travail a donc permis en premier lieu, d'acquérir de nouvelles informations sur le remodelage du VD tel que le prolongement régional des APDs aboutissant à une hétérogénéité de la repolarisation avec une altération du niveau d'expression des canaux potassiques. Cette étude a également montré une perturbation des VC au-delà des cicatrices liées à la chirurgie accompagnée d'une altération de l'expression de la protéine Cx43 et d'un remodelage pro-fibrotique de la MEC.

Dans un second temps, cette étude nous a permis de mettre en évidence pour la première fois dans le cas de la TOF réparée, un remodelage pro-arythmique du VG et ce en l'absence d'altération fonctionnelle de celui-ci. Ce remodelage s'est traduit par un allongement de l'APD₈₀ et par la diminution de la V_L pouvant être liée à une latéralisation de la Cx43. Un remodelage structurel a également été observé par une étude histologique montrant de larges zones de fibrose au sein du VG.

Ce travail précurseur soulève un certain nombre de questions et ouvre sur de nombreuses perspectives d'étude.

En effet, il serait intéressant d'évaluer l'existence ou non d'un gradient des APDs sur le cœur rTOF entier isolé et perfusé au moyen de la cartographie optique. Ainsi, il pourrait être pertinent de caractériser l'éventuel remodelage du côté postérieur du cœur avec le degré d'implication des différents canaux ioniques.

De plus, l'enregistrement des courants ioniques I_{to}, I_{Ks}, I_{Kr} par patch clamp sur des cellules isolées issues des ventricules droit et gauche des cochons rTOF pourrait compléter notre étude et apporter une information sur la nature des courants liée à la modification des APDs observés.

Un autre projet sur un modèle de cœur travaillant permettrait de replacer le cœur rTOF dans son contexte physiopathologique en modulant la pré- et post-charge mimant respectivement la fuite pulmonaire et la sténose pulmonaire.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence un remodelage pro-arythmique des deux ventricules des animaux réparés de la tétralogie de Fallot. De par cette observation, il serait judicieux de décomposer le modèle animal sur le plan chirurgical : excision des valves pulmonaires, cicatrice au niveau du RVOT, cerclage de l'AP et d'examiner quel serait l'acte réparateur le plus arythmogène par la suite. La finalité étant de mieux comprendre le substrat pro-arythmique post-opératoire afin de cibler de potentielles thérapies anti-arythmiques telles que la substitution valvulaire pulmonaire pour limiter la dysfonction ventriculaire, la prise d'inhibiteurs du système rénine-angiotensine et plus particulièrement des antagonistes aux récepteurs aux minéralocorticoïdes pour une action anti-fibrotique.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, G.W., F. Sesti, I. Splawski, M.E. Buck, M.H. Lehmann, K.W. Timothy, M.T. Keating, and S.A. Goldstein. 1999. MiRP1 forms IKr potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell*. 97:175-187.
- Adamantidis, M.M., J.F. Caron, and B.A. Dupuis. 1986. Triggered activity induced by combined mild hypoxia and acidosis in guinea-pig Purkinje fibers. *J Mol Cell Cardiol*. 18:1287-1299.
- Agarkova, I., and J.C. Perriard. 2005. The M-band: an elastic web that crosslinks thick filaments in the center of the sarcomere. *Trends Cell Biol*. 15:477-485.
- Aguero, J., K. Ishikawa, K.M. Fish, N. Hammoudi, L. Hadri, A. Garcia-Alvarez, B. Ibanez, V. Fuster, R.J. Hajjar, and J.A. Leopold. 2015. Combination proximal pulmonary artery coiling and distal embolization induces chronic elevations in pulmonary artery pressure in Swine. *PLoS One*. 10:e0124526.
- Aiba, T., and G.F. Tomaselli. 2010. Electrical remodeling in the failing heart. *Curr Opin Cardiol*. 25:29-36.
- Akar, F.G., and D.S. Rosenbaum. 2003. Transmural electrophysiological heterogeneities underlying arrhythmogenesis in heart failure. *Circ Res*. 93:638-645.
- Akar, F.G., D.D. Spragg, R.S. Tunin, D.A. Kass, and G.F. Tomaselli. 2004. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 95:717-725.
- Akar, F.G., G.X. Yan, C. Antzelevitch, and D.S. Rosenbaum. 2002. Unique topographical distribution of M cells underlies reentrant mechanism of torsade de pointes in the long-QT syndrome. *Circulation*. 105:1247-1253.
- Alings, M., and A. Wilde. 1999. "Brugada" syndrome: clinical data and suggested pathophysiological mechanism. *Circulation*. 99:666-673.
- Allingham, J.S., R. Smith, and I. Rayment. 2005. The structural basis of blebbistatin inhibition and specificity for myosin II. *Nat Struct Mol Biol*. 12:378-379.
- Altamose, G.T., and A.E. Buxton. 1999. Idiopathic ventricular tachycardia. *Annu Rev Med*. 50:159-177.
- Anderson, R.H., M.R. Boyett, H. Dobrzynski, and A.F. Moorman. 2013. The anatomy of the conduction system: implications for the clinical cardiologist. *J Cardiovasc Transl Res*. 6:187-196.
- Antzelevitch, C. 2007. Role of spatial dispersion of repolarization in inherited and acquired sudden cardiac death syndromes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H2024-2038.
- Antzelevitch, C., P. Brugada, M. Borggrefe, J. Brugada, R. Brugada, D. Corrado, I. Gussak, H. LeMarec, K. Nademanee, A.R. Perez Riera, W. Shimizu, E. Schulze-Bahr, H. Tan, and A. Wilde. 2005. Brugada syndrome: report of the second consensus conference: endorsed by the Heart Rhythm Society and the European Heart Rhythm Association. *Circulation*. 111:659-670.
- Antzelevitch, C., G.D. Pollevick, J.M. Cordeiro, O. Casis, M.C. Sanguinetti, Y. Aizawa, A. Guerchicoff, R. Pfeiffer, A. Oliva, B. Wollnik, P. Gelber, E.P. Bonaros, Jr., E. Burashnikov, Y. Wu, J.D. Sargent, S. Schickel, R. Oberheiden, A. Bhatia, L.F. Hsu, M. Haissaguerre, R. Schimpf, M. Borggrefe, and C. Wolpert. 2007. Loss-of-function mutations in the cardiac calcium channel underlie a new clinical entity characterized by ST-segment elevation, short QT intervals, and sudden cardiac death. *Circulation*. 115:442-449.
- Antzelevitch, C., S. Sicouri, S.H. Litovsky, A. Lukas, S.C. Krishnan, J.M. Di Diego, G.A. Gintant, and D.W. Liu. 1991. Heterogeneity within the ventricular wall. Electrophysiology and pharmacology of epicardial, endocardial, and M cells. *Circ Res*. 69:1427-1449.
- Apitz, C., G.D. Webb, and A.N. Redington. 2009. Tetralogy of Fallot. *Lancet*. 374:1462-1471.
- Arteyeva, N.V., J.E. Azarov, V.A. Vityazev, and D.N. Shmakov. 2015. Action potential duration gradients in the heart ventricles and the cardiac electric field during ventricular repolarization (a model study). *J Electrocardiol*. 48:678-685.

BIBLIOGRAPHIE

- Assomull, R.G., S.K. Prasad, J. Lyne, G. Smith, E.D. Burman, M. Khan, M.N. Sheppard, P.A. Poole-Wilson, and D.J. Pennell. 2006. Cardiovascular magnetic resonance, fibrosis, and prognosis in dilated cardiomyopathy. *Journal of the American College of Cardiology*. 48:1977-1985.
- Attin, M., and W.T. Clusin. 2009. Basic concepts of optical mapping techniques in cardiac electrophysiology. *Biol Res Nurs*. 11:195-207.
- Ayettey, A.S., and V. Navaratnam. 1978. The T-tubule system in the specialized and general myocardium of the rat. *J Anat*. 127:125-140.
- Azaouagh, A., S. Churzidse, T. Konorza, and R. Erbel. 2011. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: a review and update. *Clin Res Cardiol*. 100:383-394.
- Baartscheer, A., C.A. Schumacher, C.N. Belterman, R. Coronel, and J.W. Fiolet. 2003. SR calcium handling and calcium after-transients in a rabbit model of heart failure. *Cardiovasc Res*. 58:99-108.
- Babu-Narayan, S.V., P.J. Kilner, W. Li, J.C. Moon, O. Goktekin, P.A. Davlouros, M. Khan, S.Y. Ho, D.J. Pennell, and M.A. Gatzoulis. 2006. Ventricular fibrosis suggested by cardiovascular magnetic resonance in adults with repaired tetralogy of fallot and its relationship to adverse markers of clinical outcome. *Circulation*. 113:405-413.
- Babu-Narayan, S.V., A. Uebing, P.A. Davlouros, M. Kemp, S. Davidson, K. Dimopoulos, S. Bayne, D.J. Pennell, D.G. Gibson, M. Flather, P.J. Kilner, W. Li, and M.A. Gatzoulis. 2012. Randomised trial of ramipril in repaired tetralogy of Fallot and pulmonary regurgitation: the APPROPRIATE study (Ace inhibitors for Potential PREvention Of the deleterious effects of Pulmonary Regurgitation In Adults with repaired TEtralogy of Fallot). *International journal of cardiology*. 154:299-305.
- Bailliard, F., and R.H. Anderson. 2009. Tetralogy of Fallot. *Orphanet J Rare Dis*. 4:2.
- Balaji, S., Y.R. Lau, C.L. Case, and P.C. Gillette. 1997. QRS prolongation is associated with inducible ventricular tachycardia after repair of tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol*. 80:160-163.
- Balijepalli, R.C., A.J. Lokuta, N.A. Maertz, J.M. Buck, R.A. Haworth, H.H. Valdivia, and T.J. Kamp. 2003. Depletion of T-tubules and specific subcellular changes in sarcolemmal proteins in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res*. 59:67-77.
- Barry, D.M., and J.M. Nerbonne. 1996. Myocardial potassium channels: electrophysiological and molecular diversity. *Annu Rev Physiol*. 58:363-394.
- Baruscotti, M., and R.B. Robinson. 2007. Electrophysiology and pacemaker function of the developing sinoatrial node. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 293:H2613-2623.
- Bassani, R.A., J.W. Bassani, and D.M. Bers. 1992. Mitochondrial and sarcolemmal Ca²⁺ transport reduce [Ca²⁺]_i during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes. *J Physiol*. 453:591-608.
- Basso, C., D. Corrado, and G. Thiene. 1999. Cardiovascular causes of sudden death in young individuals including athletes. *Cardiol Rev*. 7:127-135.
- Basso, C., and G. Thiene. 2005. Adipositas cordis, fatty infiltration of the right ventricle, and arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Just a matter of fat? *Cardiovasc Pathol*. 14:37-41.
- Baudino, T.A., W. Carver, W. Giles, and T.K. Borg. 2006. Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 291:H1015-1026.
- Baxter, W.T., S.F. Mironov, A.V. Zaitsev, J. Jalife, and A.M. Pertsov. 2001. Visualizing excitation waves inside cardiac muscle using transillumination. *Biophys J*. 80:516-530.
- Becker, A.E., M. Connor, and R.H. Anderson. 1975. Tetralogy of Fallot: a morphometric and geometric study. *Am J Cardiol*. 35:402-412.
- Beffagna, G., G. Occhi, A. Nava, L. Vitiello, A. Ditadi, C. Basso, B. Bauce, G. Carraro, G. Thiene, J.A. Towbin, G.A. Danieli, and A. Rampazzo. 2005. Regulatory mutations in transforming growth factor-beta3 gene cause arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy type 1. *Cardiovasc Res*. 65:366-373.
- Belhassen, B., H.H. Rotmensch, and S. Laniado. 1981. Response of recurrent sustained ventricular tachycardia to verapamil. *Br Heart J*. 46:679-682.

- Benitah, J.P., J.L. Alvarez, and A.M. Gomez. 2010. L-type Ca^{2+} current in ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 48:26-36.
- Benoist, D., R. Stones, A.P. Benson, E.D. Fowler, M.J. Drinkhill, M.E. Hardy, D.A. Saint, O. Cazorla, O. Bernus, and E. White. 2014. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Prog Biophys Mol Biol.* 115:162-172.
- Benoist, D., R. Stones, M. Drinkhill, O. Bernus, and E. White. 2011. Arrhythmogenic substrate in hearts of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 300:H2230-2237.
- Benoist, D., R. Stones, M.J. Drinkhill, A.P. Benson, Z. Yang, C. Cassan, S.H. Gilbert, D.A. Saint, O. Cazorla, D.S. Steele, O. Bernus, and E. White. 2012. Cardiac arrhythmia mechanisms in rats with heart failure induced by pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302:H2381-2395.
- Berenfeld, O., S. Ennis, E. Hwang, B. Hooven, K. Grzeda, S. Mironov, M. Yamazaki, J. Kalifa, and J. Jalife. 2011. Time- and frequency-domain analyses of atrial fibrillation activation rate: the optical mapping reference. *Heart Rhythm.* 8:1758-1765.
- Bers, D.M. 2001. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. Kluwer Academic Publishers.
- Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415:198-205.
- Bers, D.M. 2006. Altered cardiac myocyte Ca regulation in heart failure. *Physiology (Bethesda).* 21:380-387.
- Bers, D.M., and V.M. Stiffel. 1993. Ratio of ryanodine to dihydropyridine receptors in cardiac and skeletal muscle and implications for E-C coupling. *Am J Physiol.* 264:C1587-1593.
- Berul, C.I., S.L. Hill, R.L. Geggel, Z.M. Hijazi, G.R. Marx, J. Rhodes, K.A. Walsh, and D.R. Fulton. 1997. Electrocardiographic markers of late sudden death risk in postoperative tetralogy of Fallot children. *Journal of cardiovascular electrophysiology.* 8:1349-1356.
- Beuckelmann, D.J., M. Nabauer, and E. Erdmann. 1991. Characteristics of calcium-current in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 23:929-937.
- Bing, O.H., H.Q. Ngo, D.E. Humphries, K.G. Robinson, E.C. Lucey, W. Carver, W.W. Brooks, C.H. Conrad, J.A. Hayes, and R.H. Goldstein. 1997. Localization of $\alpha 1(\text{I})$ collagen mRNA in myocardium from the spontaneously hypertensive rat during the transition from compensated hypertrophy to failure. *J Mol Cell Cardiol.* 29:2335-2344.
- Bogaert, J. 2012. Cardiac Function. In Clinical Cardiac MRI. J. Bogaert, S. Dymarkowski, A.M. Taylor, and V. Muthurangu, editors. Springer. 109-165.
- Bordachar, P., X. Iriart, J. Chabaneix, F. Sacher, S. Lafitte, P. Jais, M. Haissaguerre, J. Clementy, P. Dos Santos, and J.B. Thambo. 2008. Presence of ventricular dyssynchrony and haemodynamic impact of right ventricular pacing in adults with repaired Tetralogy of Fallot and right bundle branch block. *Europace.* 10:967-971.
- Boukens, B.J., V.M. Christoffels, R. Coronel, and A.F. Moorman. 2009. Developmental basis for electrophysiological heterogeneity in the ventricular and outflow tract myocardium as a substrate for life-threatening ventricular arrhythmias. *Circ Res.* 104:19-31.
- Boukens, B.J., M. Sylva, C. de Gier-de Vries, C.A. Remme, C.R. Bezzina, V.M. Christoffels, and R. Coronel. 2013. Reduced sodium channel function unmasks residual embryonic slow conduction in the adult right ventricular outflow tract. *Circ Res.* 113:137-141.
- Boulaksil, M., S.K. Winckels, M.A. Engelen, M. Stein, T.A. van Veen, J.A. Jansen, A.C. Linnenbank, M.F. Bierhuizen, W.A. Groenewegen, M.F. van Oosterhout, J.H. Kirkels, N. de Jonge, A. Varro, M.A. Vos, J.M. de Bakker, and H.V. van Rijen. 2010. Heterogeneous Connexin43 distribution in heart failure is associated with dispersed conduction and enhanced susceptibility to ventricular arrhythmias. *Eur J Heart Fail.* 12:913-921.
- Bove, T., S. Bouchez, S. De Hert, P. Wouters, F. De Somer, D. Devos, P. Somers, and G. Van Nooten. 2012. Acute and chronic effects of dysfunction of right ventricular outflow tract components

- on right ventricular performance in a porcine model: implications for primary repair of tetralogy of fallot. *Journal of the American College of Cardiology*. 60:64-71.
- Bove, T., K. Vandekerckhove, D. Devos, J. Panzer, K. De Groote, H. De Wilde, D. De Wolf, J. De Backer, L. Demulier, and K. Francois. 2014. Functional analysis of the anatomical right ventricular components: should assessment of right ventricular function after repair of tetralogy of Fallot be refined? *Eur J Cardiothorac Surg*. 45:e6-12.
- Brette, F., and C. Orchard. 2003. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res*. 92:1182-1192.
- Brette, F., and C. Orchard. 2007. Resurgence of cardiac t-tubule research. *Physiology (Bethesda)*. 22:167-173.
- Brette, F., and C.H. Orchard. 2006. No apparent requirement for neuronal sodium channels in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 98:667-674.
- Brillantes, A.B., K. Ondrias, A. Scott, E. Kibrinsky, E. Ondriasova, M.C. Moschella, T. Jayaraman, M. Landers, B.E. Ehrlich, and A.R. Marks. 1994. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein. *Cell*. 77:513-523.
- Brillantes, A.M., P. Allen, T. Takahashi, S. Izumo, and A.R. Marks. 1992. Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. *Circ Res*. 71:18-26.
- Brittain, E.L., A.R. Hemnes, M. Keebler, M. Lawson, B.F. Byrd, 3rd, and T. Disalvo. 2012. Right ventricular plasticity and functional imaging. *Pulm Circ*. 2:309-326.
- Britton, K.A., and C.S. Fox. 2011. Ectopic fat depots and cardiovascular disease. *Circulation*. 124:e837-841.
- Broberg, C.S., S.S. Chugh, C. Conklin, D.J. Sahn, and M. Jerosch-Herold. 2010. Quantification of diffuse myocardial fibrosis and its association with myocardial dysfunction in congenital heart disease. *Circulation. Cardiovascular imaging*. 3:727-734.
- Broberg, C.S., J. Huang, I. Hogberg, J. McLarry, P. Woods, L.J. Burchill, G.A. Pantely, D.J. Sahn, and M. Jerosch-Herold. 2016. Diffuse LV Myocardial Fibrosis and its Clinical Associations in Adults With Repaired Tetralogy of Fallot. *JACC Cardiovasc Imaging*. 9:86-87.
- Brooksby, P., A.J. Levi, and J.V. Jones. 1993. The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*. 11:611-622.
- Brugada, J., R. Brugada, C. Antzelevitch, J. Towbin, K. Nademanee, and P. Brugada. 2002. Long-term follow-up of individuals with the electrocardiographic pattern of right bundle-branch block and ST-segment elevation in precordial leads V1 to V3. *Circulation*. 105:73-78.
- Brugada, J., R. Brugada, and P. Brugada. 1998. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation*. 97:457-460.
- Brugada, P., and J. Brugada. 1992. Right bundle branch block, persistent ST segment elevation and sudden cardiac death: a distinct clinical and electrocardiographic syndrome. A multicenter report. *J Am Coll Cardiol*. 20:1391-1396.
- Bryant, S.M., X. Wan, S.J. Shipsey, and G. Hart. 1998. Regional differences in the delayed rectifier current (IKr and IKs) contribute to the differences in action potential duration in basal left ventricular myocytes in guinea-pig. *Cardiovasc Res*. 40:322-331.
- Buddhe, S., A. Shah, and W.W. Lai. 2015. Progression of right ventricular dilation in repaired tetralogy of Fallot. *J Magn Reson Imaging*. 41:730-737.
- Buxton, A.E., H.L. Waxman, F.E. Marchlinski, M.B. Simson, D. Cassidy, and M.E. Josephson. 1983. Right ventricular tachycardia: clinical and electrophysiologic characteristics. *Circulation*. 68:917-927.
- Camelliti, P., T.K. Borg, and P. Kohl. 2005. Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 65:40-51.
- Cannell, M.B., and W.J. Lederer. 1986. The arrhythmogenic current ITI in the absence of electrogenic sodium-calcium exchange in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol*. 374:201-219.

- Capelli, H., D. Ross, and J. Somerville. 1982. Aortic regurgitation in tetrad of Fallot and pulmonary atresia. *Am J Cardiol.* 49:1979-1983.
- Carlson, M.D., R.D. White, R.G. Trohman, L.P. Adler, L.A. Biblo, K.A. Merkatz, and A.L. Waldo. 1994. Right ventricular outflow tract ventricular tachycardia: detection of previously unrecognized anatomic abnormalities using cine magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol.* 24:720-727.
- Carozzi, A.J., E. Ikonen, M.R. Lindsay, and R.G. Parton. 2000. Role of cholesterol in developing T-tubules: analogous mechanisms for T-tubule and caveolae biogenesis. *Traffic.* 1:326-341.
- Cazorla, O., A. Freiburg, M. Helmes, T. Centner, M. McNabb, Y. Wu, K. Trombitas, S. Labeit, and H. Granzier. 2000. Differential expression of cardiac titin isoforms and modulation of cellular stiffness. *Circ Res.* 86:59-67.
- Chard, M., and R. Tabrizchi. 2009. The role of pulmonary veins in atrial fibrillation: a complex yet simple story. *Pharmacol Ther.* 124:207-218.
- Charron, S., F. Roubertie, D. Benoist, V. Dubes, S.H. Gilbert, M. Constantin, D. Vieillot, D. Elbes, B. Quesson, P. Bordachar, M. Haissaguerre, O. Bernus, J.-B. Thambo, and C. Rooryck. 2015. Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot. *PLoS ONE.* 10:e0134146.
- Chen, C.A., S.M. Dusenbery, A.M. Valente, A.J. Powell, and T. Geva. 2016. Myocardial ECV Fraction Assessed by CMR Is Associated With Type of Hemodynamic Load and Arrhythmia in Repaired Tetralogy of Fallot. *JACC Cardiovasc Imaging.* 9:1-10.
- Chen, Q., G.E. Kirsch, D. Zhang, R. Brugada, J. Brugada, P. Brugada, D. Potenza, A. Moya, M. Borggrefe, G. Breithardt, R. Ortiz-Lopez, Z. Wang, C. Antzelevitch, R.E. O'Brien, E. Schulze-Bahr, M.T. Keating, J.A. Towbin, and Q. Wang. 1998. Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation. *Nature.* 392:293-296.
- Cheng, Y.T., Y.J. Yang, H.T. Zhang, X.D. Li, S. Kang, H.Y. Qian, and J.L. Zhao. 2011. No-reflow disrupts the expression and distribution of connexin 43 in a swine model. *Microvasc Res.* 82:404-409.
- Cheung, E.W., X.C. Liang, W.W. Lam, and Y.F. Cheung. 2009. Impact of right ventricular dilation on left ventricular myocardial deformation in patients after surgical repair of tetralogy of fallot. *Am J Cardiol.* 104:1264-1270.
- Chilton, L., S. Ohya, D. Freed, E. George, V. Drobic, Y. Shibukawa, K.A. Maccannell, Y. Imaizumi, R.B. Clark, I.M. Dixon, and W.R. Giles. 2005. K⁺ currents regulate the resting membrane potential, proliferation, and contractile responses in ventricular fibroblasts and myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H2931-2939.
- Ching, L.L., A.J. Williams, and R. Sitsapesan. 2000. Evidence for Ca²⁺ activation and inactivation sites on the luminal side of the cardiac ryanodine receptor complex. *Circ Res.* 87:201-206.
- Chiu, S.N., C.T. Tsai, L.Y. Lin, S.C. Huang, Y.S. Chen, J.K. Wang, M.H. Wu, L.P. Lai, and J.L. Lin. 2015. Repolarization Alternans and Ventricular Arrhythmia in a Repaired Tetralogy of Fallot Animal Model. *J Am Heart Assoc.* 4.
- Chowdhury, U.K., S. Sathia, R. Ray, R. Singh, K.K. Pradeep, and P. Venugopal. 2006. Histopathology of the right ventricular outflow tract and its relationship to clinical outcomes and arrhythmias in patients with tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 132:270-277.
- Christoffels, V.M., W.M. Hoogaars, A. Tessari, D.E. Clout, A.F. Moorman, and M. Campione. 2004. T-box transcription factor Tbx2 represses differentiation and formation of the cardiac chambers. *Dev Dyn.* 229:763-770.
- Clancy, C.E., and Y. Rudy. 1999. Linking a genetic defect to its cellular phenotype in a cardiac arrhythmia. *Nature.* 400:566-569.
- Clusin, W.T. 2003. Calcium and cardiac arrhythmias: DADs, EADs, and alternans. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 40:337-375.
- Cohen, L.B., R.D. Keynes, and B. Hille. 1968. Light scattering and birefringence changes during nerve activity. *Nature.* 218:438-441.
- Colyer, J. 1998. Phosphorylation states of phospholamban. *Ann N Y Acad Sci.* 853:79-91.

BIBLIOGRAPHIE

- Copello, J.A., S. Barg, H. Onoue, and S. Fleischer. 1997. Heterogeneity of Ca²⁺ gating of skeletal muscle and cardiac ryanodine receptors. *Biophys J.* 73:141-156.
- Coronado, R., J. Morrisette, M. Sukhareva, and D.M. Vaughan. 1994. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol.* 266:C1485-1504.
- Coronel, R., S. Casini, T.T. Koopmann, F.J. Wilms-Schopman, A.O. Verkerk, J.R. de Groot, Z. Bhuiyan, C.R. Bezzina, M.W. Veldkamp, A.C. Linnenbank, A.C. van der Wal, H.L. Tan, P. Brugada, A.A. Wilde, and J.M. de Bakker. 2005. Right ventricular fibrosis and conduction delay in a patient with clinical signs of Brugada syndrome: a combined electrophysiological, genetic, histopathologic, and computational study. *Circulation.* 112:2769-2777.
- Coronel, R., R. Wilders, A.O. Verkerk, R.F. Wiegeler, D. Benoist, and O. Bernus. 2013. Electrophysiological changes in heart failure and their implications for arrhythmogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 1832:2432-2441.
- Coronel, R., F.J. Wilms-Schopman, T. Opthof, and M.J. Janse. 2009. Dispersion of repolarization and arrhythmogenesis. *Heart Rhythm.* 6:537-543.
- Corrado, D., and G. Thiene. 2006. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia: clinical impact of molecular genetic studies. *Circulation.* 113:1634-1637.
- Curran, J., M.J. Hinton, E. Rios, D.M. Bers, and T.R. Shannon. 2007. Beta-adrenergic enhancement of sarcoplasmic reticulum calcium leak in cardiac myocytes is mediated by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Circ Res.* 100:391-398.
- Davlouros, P.A., P.J. Kilner, T.S. Hornung, W. Li, J.M. Francis, J.C. Moon, G.C. Smith, T. Tat, D.J. Pennell, and M.A. Gatzoulis. 2002. Right ventricular function in adults with repaired tetralogy of Fallot assessed with cardiovascular magnetic resonance imaging: detrimental role of right ventricular outflow aneurysms or akinesia and adverse right-to-left ventricular interaction. *J Am Coll Cardiol.* 40:2044-2052.
- de Boer, R.A., A.A. Voors, P. Muntendam, W.H. van Gilst, and D.J. van Veldhuisen. 2009. Galectin-3: a novel mediator of heart failure development and progression. *European journal of heart failure.* 11:811-817.
- Deanfield, J.E., W.J. McKenna, P. Presbitero, D. England, G.R. Graham, and K. Hallidie-Smith. 1984. Ventricular arrhythmia in unrepaired and repaired tetralogy of Fallot. Relation to age, timing of repair, and haemodynamic status. *British heart journal.* 52:77-81.
- Deb, A., and E. Ubil. 2014. Cardiac fibroblast in development and wound healing. *J Mol Cell Cardiol.* 70:47-55.
- Desplantez, T., E. Dupont, N.J. Severs, and R. Weingart. 2007. Gap junction channels and cardiac impulse propagation. *J Membr Biol.* 218:13-28.
- Despres, J.P., I. Lemieux, J. Bergeron, P. Pibarot, P. Mathieu, E. Larose, J. Rodes-Cabau, O.F. Bertrand, and P. Poirier. 2008. Abdominal obesity and the metabolic syndrome: contribution to global cardiometabolic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28:1039-1049.
- DeVore, G.R., B. Siassi, and L.D. Platt. 1988. Fetal echocardiography. VIII. Aortic root dilatation--a marker for tetralogy of Fallot. *Am J Obstet Gynecol.* 159:129-136.
- Di Diego, J.M., Z.Q. Sun, and C. Antzelevitch. 1996. I(to) and action potential notch are smaller in left vs. right canine ventricular epicardium. *Am J Physiol.* 271:H548-561.
- Di Felice, V., and G. Zummo. 2009. Tetralogy of fallot as a model to study cardiac progenitor cell migration and differentiation during heart development. *Trends Cardiovasc Med.* 19:130-135.
- Dias, P., T. Desplantez, M.A. El-Harasis, R.A. Chowdhury, N.D. Ullrich, A. Cabestrero de Diego, N.S. Peters, N.J. Severs, K.T. MacLeod, and E. Dupont. 2014. Characterisation of connexin expression and electrophysiological properties in stable clones of the HL-1 myocyte cell line. *PLoS One.* 9:e90266.
- Diaz-Araya, G., R. Vivar, C. Humeres, P. Boza, S. Bolivar, and C. Munoz. 2015. Cardiac fibroblasts as sentinel cells in cardiac tissue: Receptors, signaling pathways and cellular functions. *Pharmacol Res.*

- Dixon, J.E., W. Shi, H.S. Wang, C. McDonald, H. Yu, R.S. Wymore, I.S. Cohen, and D. McKinnon. 1996. Role of the Kv4.3 K⁺ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current. *Circ Res.* 79:659-668.
- Downar, E., L. Harris, S. Kimber, L. Mickleborough, W. Williams, E. Sevapsidis, S. Masse, T.C. Chen, A. Chan, A. Genga, and et al. 1992. Ventricular tachycardia after surgical repair of tetralogy of Fallot: results of intraoperative mapping studies. *J Am Coll Cardiol.* 20:648-655.
- Dun, W., and P.A. Boyden. 2008. The Purkinje cell; 2008 style. *J Mol Cell Cardiol.* 45:617-624.
- Dupont, E., T. Matsushita, R.A. Kaba, C. Vozi, S.R. Coppen, N. Khan, R. Kaprielian, M.H. Yacoub, and N.J. Severs. 2001. Altered connexin expression in human congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 33:359-371.
- Efimov, I.R., V.P. Nikolski, and G. Salama. 2004. Optical imaging of the heart. *Circ Res.* 95:21-33.
- Egbe, A., S. Uppu, S. Lee, D. Ho, and S. Srivastava. 2014. Changing prevalence of severe congenital heart disease: a population-based study. *Pediatr Cardiol.* 35:1232-1238.
- Eghbali, M., O.O. Blumenfeld, S. Seifter, P.M. Buttrick, L.A. Leinwand, T.F. Robinson, M.A. Zern, and M.A. Giambone. 1989. Localization of types I, III and IV collagen mRNAs in rat heart cells by in situ hybridization. *J Mol Cell Cardiol.* 21:103-113.
- El-Sherif, N., B.J. Scherlag, R. Lazzara, and R.R. Hope. 1977. Re-entrant ventricular arrhythmias in the late myocardial infarction period. 1. Conduction characteristics in the infarction zone. *Circulation.* 55:686-702.
- Everett, A.W. 1986. Isomyosin expression in human heart in early pre- and post-natal life. *J Mol Cell Cardiol.* 18:607-615.
- Fabiato, A., and F. Fabiato. 1978. Calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of skinned cells from adult human, dog, cat, rabbit, rat, and frog hearts and from fetal and new-born rat ventricles. *Ann N Y Acad Sci.* 307:491-522.
- Farrell, M., K. Waldo, Y.X. Li, and M.L. Kirby. 1999. A novel role for cardiac neural crest in heart development. *Trends Cardiovasc Med.* 9:214-220.
- Fedorov, V.V., I.T. Lozinsky, E.A. Sosunov, E.P. Anyukhovsky, M.R. Rosen, C.W. Balke, and I.R. Efimov. 2007. Application of blebbistatin as an excitation-contraction uncoupler for electrophysiologic study of rat and rabbit hearts. *Heart Rhythm.* 4:619-626.
- Feld, Y., M. Melamed-Frank, I. Kehat, D. Tal, S. Marom, and L. Gepstein. 2002. Electrophysiological modulation of cardiomyocytic tissue by transfected fibroblasts expressing potassium channels: a novel strategy to manipulate excitability. *Circulation.* 105:522-529.
- Fernandes, F.P., C. Manlhiot, S.L. Roche, L. Grosse-Wortmann, C. Slorach, B.W. McCrindle, L. Mertens, P.F. Kantor, and M.K. Friedberg. 2012. Impaired left ventricular myocardial mechanics and their relation to pulmonary regurgitation, right ventricular enlargement and exercise capacity in asymptomatic children after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Soc Echocardiogr.* 25:494-503.
- Ferreira, G., P. Artigas, G. Pizarro, and G. Brum. 1997. Butanedione monoxime promotes voltage-dependent inactivation of L-type calcium channels in heart. Effects on gating currents. *J Mol Cell Cardiol.* 29:777-787.
- Fill, M., and J.A. Copello. 2002. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 82:893-922.
- Fischer, T.H., L.S. Maier, and S. Sossalla. 2013. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis. *Heart Fail Rev.* 18:475-483.
- Fishman, M.C., and K.R. Chien. 1997. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development.* 124:2099-2117.
- Fluhler, E., V.G. Burnham, and L.M. Loew. 1985. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry.* 24:5749-5755.
- Fontaine, G., F. Fontaliran, J.L. Hebert, D. Chemla, O. Zenati, Y. Lecarpentier, and R. Frank. 1999. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Annu Rev Med.* 50:17-35.

BIBLIOGRAPHIE

- Fowler, S.D., and P. Greenspan. 1985. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O. *J Histochem Cytochem.* 33:833-836.
- Fozzard, H.A. 2002. Cardiac sodium and calcium channels: a history of excitatory currents. *Cardiovasc Res.* 55:1-8.
- Franz, M.R. 1999. Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res.* 41:25-40.
- Franz, M.R., K. Bargheer, W. Rafflenbeul, A. Haverich, and P.R. Lichtlen. 1987. Monophasic action potential mapping in human subjects with normal electrocardiograms: direct evidence for the genesis of the T wave. *Circulation.* 75:379-386.
- Franz, M.R., C.D. Swerdlow, L.B. Liem, and J. Schaefer. 1988. Cycle length dependence of human action potential duration in vivo. Effects of single extrastimuli, sudden sustained rate acceleration and deceleration, and different steady-state frequencies. *J Clin Invest.* 82:972-979.
- Fromaget, C., A. el Aoumari, E. Dupont, J.P. Briand, and D. Gros. 1990. Changes in the expression of connexin 43, a cardiac gap junctional protein, during mouse heart development. *J Mol Cell Cardiol.* 22:1245-1258.
- Furuichi, T., D. Furutama, Y. Hakamata, J. Nakai, H. Takeshima, and K. Mikoshiba. 1994. Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci.* 14:4794-4805.
- Gabbiani, G. 1998. Evolution and clinical implications of the myofibroblast concept. *Cardiovasc Res.* 38:545-548.
- Gaborit, N., S. Le Bouter, V. Szuts, A. Varro, D. Escande, S. Nattel, and S. Demolombe. 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart. *J Physiol.* 582:675-693.
- Gaborit, N., T. Wichter, A. Varro, V. Szuts, G. Lamirault, L. Eckardt, M. Paul, G. Breithardt, E. Schulze-Bahr, D. Escande, S. Nattel, and S. Demolombe. 2009. Transcriptional profiling of ion channel genes in Brugada syndrome and other right ventricular arrhythmogenic diseases. *Eur Heart J.* 30:487-496.
- Garcia-Gras, E., R. Lombardi, M.J. Giocondo, J.T. Willerson, M.D. Schneider, D.S. Khoury, and A.J. Marian. 2006. Suppression of canonical Wnt/beta-catenin signaling by nuclear plakoglobin recapitulates phenotype of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 116:2012-2021.
- Gatzoulis, M.A., S. Balaji, S.A. Webber, S.C. Siu, J.S. Hokanson, C. Poile, M. Rosenthal, M. Nakazawa, J.H. Moller, P.C. Gillette, G.D. Webb, and A.N. Redington. 2000a. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *The Lancet.* 356:975-981.
- Gatzoulis, M.A., S. Balaji, S.A. Webber, S.C. Siu, J.S. Hokanson, C. Poile, M. Rosenthal, M. Nakazawa, J.H. Moller, P.C. Gillette, G.D. Webb, and A.N. Redington. 2000b. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study. *Lancet.* 356:975-981.
- Gatzoulis, M.A., J.A. Till, and A.N. Redington. 1997. Depolarization-repolarization inhomogeneity after repair of tetralogy of Fallot. The substrate for malignant ventricular tachycardia? *Circulation.* 95:401-404.
- Gatzoulis, M.A., J.A. Till, J. Somerville, and A.N. Redington. 1995. Mechanoelectrical interaction in tetralogy of Fallot. QRS prolongation relates to right ventricular size and predicts malignant ventricular arrhythmias and sudden death. *Circulation.* 92:231-237.
- Gaudesius, G., M. Miragoli, S.P. Thomas, and S. Rohr. 2003. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ Res.* 93:421-428.
- Gelband, H., A.L. Waldo, G.A. Kaiser, F.O. Bowman, Jr., J.R. Malm, and B.F. Hoffman. 1971. Etiology of right bundle-branch block in patients undergoing total correction of tetralogy of Fallot. *Circulation.* 44:1022-1033.

- Ghai, A., C. Silversides, L. Harris, G.D. Webb, S.C. Siu, and J. Therrien. 2002. Left ventricular dysfunction is a risk factor for sudden cardiac death in adults late after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol.* 40:1675-1680.
- Ghosh, A.K., and D.E. Vaughan. 2012. PAI-1 in tissue fibrosis. *Journal of cellular physiology.* 227:493-507.
- Giannopoulos, N.M., A.C. Chatzis, D.P. Bobos, G.V. Kirvassilis, A. Tsoutsinos, and G.E. Sarris. 2004. Tetralogy of Fallot: influence of right ventricular outflow tract reconstruction on late outcome. *Int J Cardiol.* 97 Suppl 1:87-90.
- Gillette, P.C., M.A. Yeoman, C.E. Mullins, and D.G. McNamara. 1977. Sudden death after repair of tetralogy of Fallot. Electrocardiographic and electrophysiologic abnormalities. *Circulation.* 56:566-571.
- Girouard, S.D., J.M. Pastore, K.R. Laurita, K.W. Gregory, and D.S. Rosenbaum. 1996. Optical mapping in a new guinea pig model of ventricular tachycardia reveals mechanisms for multiple wavelengths in a single reentrant circuit. *Circulation.* 93:603-613.
- Giudicessi, J.R., D. Ye, D.J. Tester, L. Crotti, A. Mugione, V.V. Nesterenko, R.M. Albertson, C. Antzelevitch, P.J. Schwartz, and M.J. Ackerman. 2011. Transient outward current (I_{to}) gain-of-function mutations in the KCND3-encoded Kv4.3 potassium channel and Brugada syndrome. *Heart Rhythm.* 8:1024-1032.
- Gladman, G., B.W. McCrindle, W.G. Williams, R.M. Freedom, and L.N. Benson. 1997. The modified Blalock-Taussig shunt: clinical impact and morbidity in Fallot's tetralogy in the current era. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 114:25-30.
- Globits, S., G. Kreiner, H. Frank, G. Heinz, U. Klaar, B. Frey, and H. Gossinger. 1997. Significance of morphological abnormalities detected by MRI in patients undergoing successful ablation of right ventricular outflow tract tachycardia. *Circulation.* 96:2633-2640.
- Glukhov, A.V., V.V. Fedorov, P.W. Kalish, V.K. Ravikumar, Q. Lou, D. Janks, R.B. Schuessler, N. Moazami, and I.R. Efimov. 2012. Conduction remodeling in human end-stage nonischemic left ventricular cardiomyopathy. *Circulation.* 125:1835-1847.
- Glukhov, A.V., V.V. Fedorov, Q. Lou, V.K. Ravikumar, P.W. Kalish, R.B. Schuessler, N. Moazami, and I.R. Efimov. 2010. Transmural dispersion of repolarization in failing and nonfailing human ventricle. *Circulation research.* 106:981-991.
- Goldmuntz, E., E. Geiger, and D.W. Benson. 2001. NKX2.5 mutations in patients with tetralogy of fallot. *Circulation.* 104:2565-2568.
- Goldsmith, E.C., A. Hoffman, M.O. Morales, J.D. Potts, R.L. Price, A. McFadden, M. Rice, and T.K. Borg. 2004. Organization of fibroblasts in the heart. *Dev Dyn.* 230:787-794.
- Goldstein, J.A. 2002. Pathophysiology and management of right heart ischemia. *J Am Coll Cardiol.* 40:841-853.
- Gorla, R., A. Macchi, I. Franzoni, I. Rosa, F. Buzzetti, A.G. Pavon, and A. Margonato. 2012. Unrepaired tetralogy of fallot in an 85-year-old man. *Congenit Heart Dis.* 7:E78-81.
- Gosling, J.A., P.F. Harris, I. Whitmore, and P.L.T. William. 2002. Anatomie humaine : Atlas en couleurs.
- Grabitz, R.G., M.R. Joffres, and R.L. Collins-Nakai. 1988. Congenital heart disease: incidence in the first year of life. The Alberta Heritage Pediatric Cardiology Program. *Am J Epidemiol.* 128:381-388.
- Gray, R.A., J. Jalife, A.V. Panfilov, W.T. Baxter, C. Cabo, J.M. Davidenko, and A.M. Pertsov. 1995. Mechanisms of cardiac fibrillation. *Science.* 270:1222-1223; author reply 1224-1225.
- Greve, G., M.J. Lab, R. Chen, D. Barron, P.A. White, A.N. Redington, and D.J. Penny. 2001. Right ventricular distension alters monophasic action potential duration during pulmonary arterial occlusion in anaesthetised lambs: evidence for arrhythmogenic right ventricular mechano-electrical feedback. *Experimental physiology.* 86:651-657.
- Gross, E., R.S. Bedlack, Jr., and L.M. Loew. 1994. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. *Biophys J.* 67:208-216.

BIBLIOGRAPHIE

- Grossman, A., E. Barenboim, B. Azaria, Y. Sherer, and L. Goldstein. 2004. Arrhythmogenic right ventricular dysplasia: a possible cause of sudden incapacitation. *Aviat Space Environ Med.* 75:697-699.
- Gussak, I., P. Bjerregaard, and S.C. Hammill. 2001. Clinical diagnosis and risk stratification in patients with Brugada syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 37:1635-1638.
- Guyton, A.C., and J.E. Hall. 2006. Textbook of medical physiology, Philadelphia
- Haddad, F., R. Doyle, D.J. Murphy, and S.A. Hunt. 2008a. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation.* 117:1717-1731.
- Haddad, F., S.A. Hunt, D.N. Rosenthal, and D.J. Murphy. 2008b. Right ventricular function in cardiovascular disease, part I: Anatomy, physiology, aging, and functional assessment of the right ventricle. *Circulation.* 117:1436-1448.
- Haissaguerre, M., P. Jais, D.C. Shah, A. Takahashi, M. Hocini, G. Quiniou, S. Garrigue, A. Le Mouroux, P. Le Metayer, and J. Clementy. 1998. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins. *N Engl J Med.* 339:659-666.
- Hardziyenka, M., M.E. Campian, A.O. Verkerk, S. Surie, A.C. van Ginneken, S. Hakim, A.C. Linnenbank, H.A. de Bruin-Bon, L. Beekman, M.N. van der Plas, C.A. Remme, T.A. van Veen, P. Bresser, J.M. de Bakker, and H.L. Tan. 2012. Electrophysiologic remodeling of the left ventricle in pressure overload-induced right ventricular failure. *J Am Coll Cardiol.* 59:2193-2202.
- Harrelson, Z., R.G. Kelly, S.N. Goldin, J.J. Gibson-Brown, R.J. Bollag, L.M. Silver, and V.E. Papaioannou. 2004. Tbx2 is essential for patterning the atrioventricular canal and for morphogenesis of the outflow tract during heart development. *Development.* 131:5041-5052.
- He, J., M.W. Conklin, J.D. Foell, M.R. Wolff, R.A. Haworth, R. Coronado, and T.J. Kamp. 2001. Reduction in density of transverse tubules and L-type Ca(2+) channels in canine tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc Res.* 49:298-307.
- Helbing, W.A., A.A. Roest, R.A. Niezen, H.W. Vliegen, M.G. Hazekamp, J. Ottenkamp, A. de Roos, and E.E. van der Wall. 2002. ECG predictors of ventricular arrhythmias and biventricular size and wall mass in tetralogy of Fallot with pulmonary regurgitation. *Heart.* 88:515-519.
- Hill, J.A. 2003. Electrical remodeling in cardiac hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med.* 13:316-322.
- Hiraoka, M., A. Sunami, Z. Fan, and T. Sawanobori. 1992. Multiple ionic mechanisms of early afterdepolarizations in isolated ventricular myocytes from guinea-pig hearts. *Ann N Y Acad Sci.* 644:33-47.
- Ho, S.Y. 2009. Anatomy and myoarchitecture of the left ventricular wall in normal and in disease. *Eur J Echocardiogr.* 10:iii3-7.
- Ho, S.Y., and P. Nihoyannopoulos. 2006. Anatomy, echocardiography, and normal right ventricular dimensions. *Heart.* 92 Suppl 1:i2-13.
- Hong, T., H. Yang, S.S. Zhang, H.C. Cho, M. Kalashnikova, B. Sun, H. Zhang, A. Bhargava, M. Grabe, J. Olgin, J. Gorelik, E. Marban, L.Y. Jan, and R.M. Shaw. 2014. Cardiac BIN1 folds T-tubule membrane, controlling ion flux and limiting arrhythmia. *Nat Med.* 20:624-632.
- Hooks, D.A., I.J. LeGrice, J.D. Harvey, and B.H. Smaill. 2001. Intramural multisite recording of transmembrane potential in the heart. *Biophys J.* 81:2671-2680.
- Hubbard, M.L., W. Ying, and C.S. Henriquez. 2007. Effect of gap junction distribution on impulse propagation in a monolayer of myocytes: a model study. *Europace.* 9 Suppl 6:vi20-28.
- Huo, R., Y. Sheng, W.T. Guo, and D.L. Dong. 2014. The potential role of Kv4.3 K⁺ channel in heart hypertrophy. *Channels (Austin).* 8:203-209.
- Hussain, W., P.M. Patel, R.A. Chowdhury, C. Cabo, E.J. Ciaccio, M.J. Lab, H.S. Duffy, A.L. Wit, and N.S. Peters. 2010. The Renin-Angiotensin system mediates the effects of stretch on conduction velocity, connexin43 expression, and redistribution in intact ventricle. *Journal of cardiovascular electrophysiology.* 21:1276-1283.
- Hutchinson, K.R., J.A. Stewart, Jr., and P.A. Lucchesi. 2010. Extracellular matrix remodeling during the progression of volume overload-induced heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology.* 48:564-569.

- Iacobellis, G., D. Corradi, and A.M. Sharma. 2005. Epicardial adipose tissue: anatomic, biomolecular and clinical relationships with the heart. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2:536-543.
- Ino, T., H.S. Karagueuzian, K. Hong, M. Meesmann, W.J. Mandel, and T. Peter. 1988. Relation of monophasic action potential recorded with contact electrode to underlying transmembrane action potential properties in isolated cardiac tissues: a systematic microelectrode validation study. *Cardiovasc Res*. 22:255-264.
- Iwasaki, Y.K., K. Nishida, T. Kato, and S. Nattel. 2011. Atrial fibrillation pathophysiology: implications for management. *Circulation*. 124:2264-2274.
- James, T.N. 1967. Cardiac innervation: anatomic and pharmacologic relations. *Bull N Y Acad Med*. 43:1041-1086.
- Janse, M.J., R. Coronel, T. Opthof, E.A. Sosunov, E.P. Anyukhovsky, and M.R. Rosen. 2012. Repolarization gradients in the intact heart: transmural or apico-basal? *Prog Biophys Mol Biol*. 109:6-15.
- Janvier, N.C., S.O. McMorn, S.M. Harrison, P. Taggart, and M.R. Boyett. 1997. The role of Na(+)-Ca²⁺ exchange current in electrical restitution in ferret ventricular cells. *J Physiol*. 504 (Pt 2):301-314.
- Jiang, M., C. Cabo, J. Yao, P.A. Boyden, and G. Tseng. 2000. Delayed rectifier K currents have reduced amplitudes and altered kinetics in myocytes from infarcted canine ventricle. *Cardiovasc Res*. 48:34-43.
- Jochim, K., L.N. Katz, and W. Mayne. 1935. The Monophasic Electrogram obtained from the mammalian heart. *American Journal of Physiology* 111:177-186.
- Jonas, R.A. 2009. Early primary repair of tetralogy of Fallot. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*:39-47.
- Jongsma, H.J., and R. Wilders. 2000. Gap junctions in cardiovascular disease. *Circ Res*. 86:1193-1197.
- Joshi, S., and D.J. Wilber. 2005. Ablation of idiopathic right ventricular outflow tract tachycardia: current perspectives. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 16 Suppl 1:S52-58.
- Jurkiewicz, N.K., and M.C. Sanguinetti. 1993. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by a methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K⁺ current by dofetilide. *Circ Res*. 72:75-83.
- Kaab, S., J. Dixon, J. Duc, D. Ashen, M. Nabauer, D.J. Beuckelmann, G. Steinbeck, D. McKinnon, and G.F. Tomaselli. 1998. Molecular basis of transient outward potassium current downregulation in human heart failure: a decrease in Kv4.3 mRNA correlates with a reduction in current density. *Circulation*. 98:1383-1393.
- Kapel, G.F., T. Reichlin, A.P. Wijnmaalen, S.R. Piers, E.R. Holman, U.B. Tedrow, M.J. Schalij, W.G. Stevenson, and K. Zeppenfeld. 2015. Re-entry using anatomically determined isthmuses: a curable ventricular tachycardia in repaired congenital heart disease. *Circulation. Arrhythmia and electrophysiology*. 8:102-109.
- Karl, T.R. 2008. Tetralogy of Fallot: Current surgical perspective. *Ann Pediatr Cardiol*. 1:93-100.
- Karl, T.R. 2012. Tetralogy of fallot: a surgical perspective. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg*. 45:213-224.
- Kavey, R.E., F.D. Thomas, C.J. Byrum, M.S. Blackman, H.M. Sondheimer, and E.L. Bove. 1984. Ventricular arrhythmias and biventricular dysfunction after repair of tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol*. 4:126-131.
- Kawara, T., R. Derksen, J.R. de Groot, R. Coronel, S. Tasseron, A.C. Linnenbank, R.N. Hauer, H. Kirkels, M.J. Janse, and J.M. de Bakker. 2001. Activation delay after premature stimulation in chronically diseased human myocardium relates to the architecture of interstitial fibrosis. *Circulation*. 104:3069-3075.
- Kay, W.A., S.C. Cook, and C.J. Daniels. 2013. Evaluation by MRA of aortic dilation late after repair of tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol*. 167:2922-2927.
- Kelley, K.W., S.E. Curtis, G.T. Marzan, H.M. Karara, and C.R. Anderson. 1973. Body surface area of female swine. *J Anim Sci*. 36:927-930.

BIBLIOGRAPHIE

- Kelly, R.G., N.A. Brown, and M.E. Buckingham. 2001. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 1:435-440.
- Kelly, R.G., and M.E. Buckingham. 2002. The anterior heart-forming field: voyage to the arterial pole of the heart. *Trends Genet*. 18:210-216.
- Kettlewell, S., N.L. Walker, S.M. Cobbe, F.L. Burton, and G.L. Smith. 2004. The electrophysiological and mechanical effects of 2,3-butane-dione monoxime and cytochalasin-D in the Langendorff perfused rabbit heart. *Exp Physiol*. 89:163-172.
- Khairy, P., J. Aboulhosn, M.Z. Gurm, A.R. Opatowsky, F.P. Monge, J. Kay, A.M. Valente, M.G. Earing, G. Lui, D.R. Gersony, S. Cook, J.G. Ting, M.J. Nickolaus, G. Webb, M.J. Landzberg, C.S. Broberg, and C. Alliance for Adult Research in Congenital. 2010. Arrhythmia burden in adults with surgically repaired tetralogy of Fallot: a multi-institutional study. *Circulation*. 122:868-875.
- Khairy, P., and W.G. Stevenson. 2009. Catheter ablation in tetralogy of Fallot. *Heart Rhythm*. 6:1069-1074.
- Khoshnood, B., C. De Vigan, V. Vodovar, J. Goujard, A. Lhomme, D. Bonnet, and F. Goffinet. 2005. Trends in prenatal diagnosis, pregnancy termination, and perinatal mortality of newborns with congenital heart disease in France, 1983-2000: a population-based evaluation. *Pediatrics*. 115:95-101.
- Kim, H., S.C. Sung, S.H. Kim, Y.H. Chang, H.D. Lee, J.A. Park, and Y.S. Lee. 2013. Early and late outcomes of total repair of tetralogy of Fallot: risk factors for late right ventricular dilatation. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 17:956-962.
- Kinch, J.W., and T.J. Ryan. 1994. Right ventricular infarction. *N Engl J Med*. 330:1211-1217.
- Knisley, S.B. 1995. Transmembrane voltage changes during unipolar stimulation of rabbit ventricle. *Circ Res*. 77:1229-1239.
- Kogler, H., O. Hartmann, K. Leineweber, P. Nguyen van, P. Schott, O.E. Brodde, and G. Hasenfuss. 2003. Mechanical load-dependent regulation of gene expression in monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res*. 93:230-237.
- Kohl, P., P. Camelliti, F.L. Burton, and G.L. Smith. 2005. Electrical coupling of fibroblasts and myocytes: relevance for cardiac propagation. *J Electrocardiol*. 38:45-50.
- Kolcz, J., J. Drukala, M. Bzowska, B. Rajwa, W. Korohoda, and E. Malec. 2005. The expression of connexin 43 in children with Tetralogy of Fallot. *Cell Mol Biol Lett*. 10:287-303.
- Kolega, J. 2004. Phototoxicity and photoinactivation of blebbistatin in UV and visible light. *Biochem Biophys Res Commun*. 320:1020-1025.
- Komukai, K., F. Brette, T.T. Yamanushi, and C.H. Orchard. 2002. K(+) current distribution in rat sub-epicardial ventricular myocytes. *Pflugers Arch*. 444:532-538.
- Konarzewska, H., G.A. Peeters, and M.C. Sanguinetti. 1995. Repolarizing K⁺ currents in nonfailing human hearts. Similarities between right septal subendocardial and left subepicardial ventricular myocytes. *Circulation*. 92:1179-1187.
- Kontogeorgis, A., X. Li, E.Y. Kang, J.E. Feig, M. Ponzio, G. Kang, R.A. Kaba, A.L. Wit, E.A. Fisher, G.E. Morley, N.S. Peters, W.A. Coetzee, and D.E. Gutstein. 2008. Decreased connexin43 expression in the mouse heart potentiates pacing-induced remodeling of repolarizing currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 295:H1905-1916.
- Kozak, M.F., A. Redington, S.J. Yoo, M. Seed, A. Greiser, and L. Grosse-Wortmann. 2014. Diffuse myocardial fibrosis following tetralogy of Fallot repair: a T1 mapping cardiac magnetic resonance study. *Pediatr Radiol*. 44:403-409.
- Kreuzberg, M.M., K. Willecke, and F.F. Bukauskas. 2006. Connexin-mediated cardiac impulse propagation: connexin 30.2 slows atrioventricular conduction in mouse heart. *Trends Cardiovasc Med*. 16:266-272.
- Kunze, D.L. 1977. Rate-dependent changes in extracellular potassium in the rabbit atrium. *Circ Res*. 41:122-127.

- Kuo, C.S., K. Munakata, C.P. Reddy, and B. Surawicz. 1983. Characteristics and possible mechanism of ventricular arrhythmia dependent on the dispersion of action potential durations. *Circulation*. 67:1356-1367.
- Kuo, C.T., E.E. Morrisey, R. Anandappa, K. Sigrist, M.M. Lu, M.S. Parmacek, C. Soudais, and J.M. Leiden. 1997. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev*. 11:1048-1060.
- Kurabayashi, M., H. Tsuchimochi, I. Komuro, F. Takaku, and Y. Yazaki. 1988. Molecular cloning and characterization of human cardiac alpha- and beta-form myosin heavy chain complementary DNA clones. Regulation of expression during development and pressure overload in human atrium. *J Clin Invest*. 82:524-531.
- Kuro-o, M., H. Tsuchimochi, S. Ueda, F. Takaku, and Y. Yazaki. 1986. Distribution of cardiac myosin isozymes in human conduction system. Immunohistochemical study using monoclonal antibodies. *J Clin Invest*. 77:340-347.
- Lacampagne, A., J. Fauconnier, and S. Richard. 2008. [Ryanodine receptor and heart disease]. *Med Sci (Paris)*. 24:399-405.
- Lacroix, D., P. Gluais, C. Marquie, C. D'Hoinne, M. Adamantidis, and M. Bastide. 2002. Repolarization abnormalities and their arrhythmogenic consequences in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 54:42-50.
- Lal, H., S.K. Verma, M. Smith, R.S. Guleria, G. Lu, D.M. Foster, and D.E. Dostal. 2007. Stretch-induced MAP kinase activation in cardiac myocytes: differential regulation through beta1-integrin and focal adhesion kinase. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 43:137-147.
- Lambert, V., A. Capderou, E. Le Bret, C. Rucker-Martin, E. Deroubaix, E. Gouadon, N. Raymond, B. Stos, A. Serraf, and J.F. Renaud. 2010. Right ventricular failure secondary to chronic overload in congenital heart disease: an experimental model for therapeutic innovation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 139:1197-1204, 1204 e1191.
- Lee, J.K., I. Kodama, H. Honjo, T. Anno, K. Kamiya, and J. Toyama. 1997. Stage-dependent changes in membrane currents in rats with monocrotaline-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol*. 272:H2833-2842.
- Lerman, B.B. 1993. Response of nonreentrant catecholamine-mediated ventricular tachycardia to endogenous adenosine and acetylcholine. Evidence for myocardial receptor-mediated effects. *Circulation*. 87:382-390.
- Lerman, B.B., L. Belardinelli, G.A. West, R.M. Berne, and J.P. DiMarco. 1986. Adenosine-sensitive ventricular tachycardia: evidence suggesting cyclic AMP-mediated triggered activity. *Circulation*. 74:270-280.
- Levine, J.H., J.F. Spear, T. Guarnieri, M.L. Weisfeldt, C.D. de Langen, L.C. Becker, and E.N. Moore. 1985. Cesium chloride-induced long QT syndrome: demonstration of afterdepolarizations and triggered activity in vivo. *Circulation*. 72:1092-1103.
- Li, G.R., X.L. Du, Y.L. Siow, K. O, H.F. Tse, and C.P. Lau. 2003. Calcium-activated transient outward chloride current and phase 1 repolarization of swine ventricular action potential. *Cardiovasc Res*. 58:89-98.
- Li, G.R., B. Yang, J. Feng, R.F. Bosch, M. Carrier, and S. Nattel. 1999. Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 276:H98-H106.
- Lindsay, E.A., A. Botta, V. Jurecic, S. Carattini-Rivera, Y.C. Cheah, H.M. Rosenblatt, A. Bradley, and A. Baldini. 1999. Congenital heart disease in mice deficient for the DiGeorge syndrome region. *Nature*. 401:379-383.
- Liu, D.W., and C. Antzelevitch. 1995. Characteristics of the delayed rectifier current (I_{Kr} and I_{Ks}) in canine ventricular epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes. A weaker I_{Ks} contributes to the longer action potential of the M cell. *Circ Res*. 76:351-365.
- Liu, D.W., G.A. Gintant, and C. Antzelevitch. 1993. Ionic bases for electrophysiological distinctions among epicardial, midmyocardial, and endocardial myocytes from the free wall of the canine left ventricle. *Circ Res*. 72:671-687.

BIBLIOGRAPHIE

- Locher, M.R., M.V. Razumova, J.E. Stelzer, H.S. Norman, J.R. Patel, and R.L. Moss. 2009. Determination of rate constants for turnover of myosin isoforms in rat myocardium: implications for in vivo contractile kinetics. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 297:H247-256.
- Loew, L.M., L.B. Cohen, J. Dix, E.N. Fluhler, V. Montana, G. Salama, and J.Y. Wu. 1992. A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. *J Membr Biol*. 130:1-10.
- Long, V.P., 3rd, I.M. Bonilla, P. Vargas-Pinto, Y. Nishijima, A. Sridhar, C. Li, K. Mowrey, P. Wright, M. Velayutham, S. Kumar, N.Y. Lee, J.L. Zweier, P.J. Mohler, S. Gyorke, and C.A. Carnes. 2015. Heart failure duration progressively modulates the arrhythmia substrate through structural and electrical remodeling. *Life Sci*. 123:61-71.
- Lorenz, C.H., E.S. Walker, V.L. Morgan, S.S. Klein, and T.P. Graham, Jr. 1999. Normal human right and left ventricular mass, systolic function, and gender differences by cine magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson*. 1:7-21.
- Lou, Q., W. Li, and I.R. Efimov. 2012. The role of dynamic instability and wavelength in arrhythmia maintenance as revealed by panoramic imaging with blebbistatin vs. 2,3-butanedione monoxime. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 302:H262-269.
- Louch, W.E., V. Bito, F.R. Heinzel, R. Macianskiene, J. Vanhaecke, W. Flameng, K. Mubagwa, and K.R. Sipido. 2004. Reduced synchrony of Ca²⁺ release with loss of T-tubules-a comparison to Ca²⁺ release in human failing cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*. 62:63-73.
- Louch, W.E., H.K. Mork, J. Sexton, T.A. Stromme, P. Laake, I. Sjaastad, and O.M. Sejersted. 2006. T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca²⁺ release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction. *J Physiol*. 574:519-533.
- Luke, R.A., and J.E. Saffitz. 1991. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine infarct border zones. *J Clin Invest*. 87:1594-1602.
- Lyons, G.E., S. Schiaffino, D. Sassoon, P. Barton, and M. Buckingham. 1990. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol*. 111:2427-2436.
- Lyons, I., L.M. Parsons, L. Hartley, R. Li, J.E. Andrews, L. Robb, and R.P. Harvey. 1995. Myogenic and morphogenetic defects in the heart tubes of murine embryos lacking the homeo box gene Nkx2-5. *Genes Dev*. 9:1654-1666.
- Lytrivi, I.D., H.H. Ko, S. Srivastava, K. Norton, J. Goldman, I.A. Parness, W.W. Lai, and J.C. Nielsen. 2004. Regional differences in right ventricular systolic function as determined by cine magnetic resonance imaging after infundibulotomy. *Am J Cardiol*. 94:970-973.
- MacKenna, D., S.R. Summerour, and F.J. Villarreal. 2000. Role of mechanical factors in modulating cardiac fibroblast function and extracellular matrix synthesis. *Cardiovasc Res*. 46:257-263.
- Maier, S.K., R.E. Westenbroek, K.A. Schenkman, E.O. Feigl, T. Scheuer, and W.A. Catterall. 2002. An unexpected role for brain-type sodium channels in coupling of cell surface depolarization to contraction in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:4073-4078.
- Mainwaring, R.D., J.J. Lamberti, J.W. Moore, G.F. Billman, T.L. Carter, and J.C. Nelson. 1996. Tetralogy of Fallot repair results in activation of the renin-angiotensin-aldosterone system. *European heart journal*. 17:1421-1425.
- Makowski, L., D.L. Caspar, W.C. Phillips, T.S. Baker, and D.A. Goodenough. 1984. Gap junction structures. VI. Variation and conservation in connexon conformation and packing. *Biophys J*. 45:208-218.
- Marchington, J.M., C.A. Mattacks, and C.M. Pond. 1989. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, foetal development and biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B*. 94:225-232.
- Marcus, F.I., W.J. McKenna, D. Sherrill, C. Basso, B. Bauce, D.A. Bluemke, H. Calkins, D. Corrado, M.G. Cox, J.P. Daubert, G. Fontaine, K. Gear, R. Hauer, A. Nava, M.H. Picard, N. Protonotarios, J.E. Saffitz, D.M. Sanborn, J.S. Steinberg, H. Tandri, G. Thiene, J.A. Towbin, A. Tsatsopoulou, T. Wichter, and W. Zareba. 2010. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular

- cardiomyopathy/dysplasia: proposed modification of the task force criteria. *Circulation*. 121:1533-1541.
- Marie, P.Y., F. Marcon, F. Brunotte, S. Briancon, N. Danchin, A.M. Worms, J. Robert, and C. Pernot. 1992. Right ventricular overload and induced sustained ventricular tachycardia in operatively "repaired" tetralogy of Fallot. *Am J Cardiol*. 69:785-789.
- Marieb, E.N. 1999. Anatomie et Physiologie Humaines. De Boeck University
- Marx, S.O., S. Reiken, Y. Hisamatsu, T. Jayaraman, D. Burkhoff, N. Rosembliit, and A.R. Marks. 2000. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell*. 101:365-376.
- McElhinney, D.B., E. Geiger, J. Blinder, D.W. Benson, and E. Goldmuntz. 2003. NKX2.5 mutations in patients with congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol*. 42:1650-1655.
- McKenna, W.J., G. Thiene, A. Nava, F. Fontaliran, C. Blomstrom-Lundqvist, G. Fontaine, and F. Camerini. 1994. Diagnosis of arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. Task Force of the Working Group Myocardial and Pericardial Disease of the European Society of Cardiology and of the Scientific Council on Cardiomyopathies of the International Society and Federation of Cardiology. *Br Heart J*. 71:215-218.
- Mehlem, A., C.E. Hagberg, L. Muhl, U. Eriksson, and A. Falkevall. 2013. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*. 8:1149-1154.
- Meinertz, T., T. Hofmann, W. Kasper, N. Treese, H. Bechtold, U. Stienen, T. Pop, E.R. Leitner, D. Andresen, and J. Meyer. 1984. Significance of ventricular arrhythmias in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 53:902-907.
- Menting, M.E., J.A. Eindhoven, A.E. van den Bosch, J.A. Cuypers, T.P. Ruys, B.M. van Dalen, J.S. McGhie, M. Witsenburg, W.A. Helbing, M.L. Geleijnse, and J.W. Roos-Hesselink. 2014. Abnormal left ventricular rotation and twist in adult patients with corrected tetralogy of Fallot. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 15:566-574.
- Meregalli, P.G., A.A. Wilde, and H.L. Tan. 2005. Pathophysiological mechanisms of Brugada syndrome: depolarization disorder, repolarization disorder, or more? *Cardiovasc Res*. 67:367-378.
- Meyer, M., W. Schillinger, B. Pieske, C. Holubarsch, C. Heilmann, H. Posival, G. Kuwajima, K. Mikoshiba, H. Just, G. Hasenfuss, and et al. 1995. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 92:778-784.
- Michielon, G., B. Marino, R. Formigari, G. Gargiulo, F. Picchio, M.C. Digilio, S. Anaclerio, G. Oricchio, S.P. Sanders, and R.M. Di Donato. 2006. Genetic syndromes and outcome after surgical correction of tetralogy of Fallot. *Ann Thorac Surg*. 81:968-975.
- Milting, H., N. Lukas, B. Klauke, R. Korfer, A. Perrot, K.J. Osterziel, J. Vogt, S. Peters, R. Thieleczek, and M. Varsanyi. 2006. Composite polymorphisms in the ryanodine receptor 2 gene associated with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 71:496-505.
- Molkentin, J.D., Q. Lin, S.A. Duncan, and E.N. Olson. 1997. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev*. 11:1061-1072.
- Momma, K. 2010. Cardiovascular anomalies associated with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Cardiol*. 105:1617-1624.
- Mont, L., T. Seixas, P. Brugada, J. Brugada, F. Simonis, L.M. Rodriguez, J.L. Smeets, and H.J. Wellens. 1991. Clinical and electrophysiologic characteristics of exercise-related idiopathic ventricular tachycardia. *Am J Cardiol*. 68:897-900.
- Moore, J.P., A. Seki, K.M. Shannon, R. Mandapati, R. Tung, and M.C. Fishbein. 2013. Characterization of anatomic ventricular tachycardia isthmus pathology after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Circ Arrhythm Electrophysiol*. 6:905-911.
- Moorman, A.F., and V.M. Christoffels. 2003. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*. 83:1223-1267.
- Morano, I. 1999. Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med (Berl)*. 77:544-555.

BIBLIOGRAPHIE

- Moric-Janiszewska, E., and G. Markiewicz-Loskot. 2007. Review on the genetics of arrhythmogenic right ventricular dysplasia. *Europace*. 9:259-266.
- Morita, H., D.P. Zipes, K. Fukushima-Kusano, S. Nagase, K. Nakamura, S.T. Morita, T. Ohe, and J. Wu. 2008. Repolarization heterogeneity in the right ventricular outflow tract: correlation with ventricular arrhythmias in Brugada patients and in an in vitro canine Brugada model. *Heart Rhythm*. 5:725-733.
- Morita, N., J.H. Lee, A. Bapat, M.C. Fishbein, W.J. Mandel, P.S. Chen, J.N. Weiss, and H.S. Karagueuzian. 2011. Glycolytic inhibition causes spontaneous ventricular fibrillation in aged hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301:H180-191.
- Morwood, J.G., J.K. Triedman, C.I. Berul, P. Khairy, M.E. Alexander, F. Cecchin, and E.P. Walsh. 2004. Radiofrequency catheter ablation of ventricular tachycardia in children and young adults with congenital heart disease. *Heart Rhythm*. 1:301-308.
- Moss, A.J., and J.P. Daubert. 2000. Images in clinical medicine. Internal ventricular defibrillation. *N Engl J Med*. 342:398.
- Muzzarelli, S., K.G. Ordovas, G. Cannavale, A.K. Meadows, and C.B. Higgins. 2011. Tetralogy of Fallot: impact of the excursion of the interventricular septum on left ventricular systolic function and fibrosis after surgical repair. *Radiology*. 259:375-383.
- Nabauer, M., D.J. Beuckelmann, P. Uberfuhr, and G. Steinbeck. 1996. Regional differences in current density and rate-dependent properties of the transient outward current in subepicardial and subendocardial myocytes of human left ventricle. *Circulation*. 93:168-177.
- Naccarelli, G.V., and C. Antzelevitch. 2001. The Brugada syndrome: clinical, genetic, cellular, and molecular abnormalities. *Am J Med*. 110:573-581.
- Nademanee, K. 1997. Sudden unexplained death syndrome in Southeast Asia. *Am J Cardiol*. 79:10-11.
- Neeb, Z., J.D. Lajiness, E. Bolanis, and S.J. Conway. 2013. Cardiac outflow tract anomalies. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. 2:499-530.
- Negretti, N., S.C. O'Neill, and D.A. Eisner. 1993. The relative contributions of different intracellular and sarcolemmal systems to relaxation in rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 27:1826-1830.
- Nemer, G., F. Fadlalah, J. Usta, M. Nemer, G. Dbaiho, M. Obeid, and F. Bitar. 2006. A novel mutation in the GATA4 gene in patients with Tetralogy of Fallot. *Hum Mutat*. 27:293-294.
- Nerbonne, J.M. 2000. Molecular basis of functional voltage-gated K⁺ channel diversity in the mammalian myocardium. *J Physiol*. 525 Pt 2:285-298.
- Nerbonne, J.M., and R.S. Kass. 2005. Molecular physiology of cardiac repolarization. *Physiol Rev*. 85:1205-1253.
- Netter, F.H. 1993. Atlas der Anatomie des Menschen. 4th ed. New York: Ciba Geigy Corporation.
- Neylon, C.B., S.M. Richards, M.A. Larsen, A. Agrotis, and A. Bobik. 1995. Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*. 215:814-821.
- Noszczyk-Nowak, A., J. Nicpon, M. Nowak, and P. Slawuta. 2009. Preliminary reference values for electrocardiography, echocardiography and myocardial morphometry in the European brown hare (*Lepus europaeus*). *Acta Vet Scand*. 51:6.
- Nuss, H.B., and S.R. Houser. 1991. Voltage dependence of contraction and calcium current in severely hypertrophied feline ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 23:717-726.
- Nuss, H.B., and S.R. Houser. 1993. T-type Ca²⁺ current is expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes. *Circ Res*. 73:777-782.
- Oechslin, E.N., D.A. Harrison, L. Harris, E. Downar, G.D. Webb, S.S. Siu, and W.G. Williams. 1999. Reoperation in adults with repair of tetralogy of fallot: indications and outcomes. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 118:245-251.
- Ohe, T., K. Shimomura, N. Aihara, S. Kamakura, M. Matsuhisa, I. Sato, H. Nakagawa, and A. Shimizu. 1988. Idiopathic sustained left ventricular tachycardia: clinical and electrophysiologic characteristics. *Circulation*. 77:560-568.

- Ono, N., T. Yamaguchi, H. Ishikawa, M. Arakawa, N. Takahashi, T. Saikawa, and T. Shimada. 2009. Morphological varieties of the Purkinje fiber network in mammalian hearts, as revealed by light and electron microscopy. *Arch Histol Cytol.* 72:139-149.
- Osadchii, O.E. 2012. Impact of Na(+) channel blockers on transmural dispersion of refractoriness and arrhythmic susceptibility in guinea-pig left ventricle. *Eur J Pharmacol.* 691:173-181.
- Ou, B., M. Nakagawa, M. Kajimoto, S. Nobe, T. Ooie, M. Ichinose, H. Yonemochi, N. Ono, T. Shimada, and T. Saikawa. 2005. Heterogeneous expression of connexin 43 in the myocardium of rabbit right ventricular outflow tract. *Life Sci.* 77:52-59.
- Paladini, D., G. Pacileo, S. Palmieri, M.G. Russo, A. Conti, B.D. Piccola, and P. Martinelli. 1998. Prenatal diagnosis of 22q11 microdeletion in a fetus with a conotruncal heart defect. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 11:68-70.
- Parisot, P., K. Mesbah, M. Theveniau-Ruissy, and R.G. Kelly. 2011. Tbx1, subpulmonary myocardium and conotruncal congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 91:477-484.
- Park, K.M., Y.H. Kim, and F.E. Marchlinski. 2012. Using the surface electrocardiogram to localize the origin of idiopathic ventricular tachycardia. *Pacing Clin Electrophysiol.* 35:1516-1527.
- Peng, Y., Z.R. Gregorich, S.G. Valeja, H. Zhang, W. Cai, Y.C. Chen, H. Guner, A.J. Chen, D.J. Schwahn, T.A. Hacker, X. Liu, and Y. Ge. 2014. Top-down proteomics reveals concerted reductions in myofilament and Z-disc protein phosphorylation after acute myocardial infarction. *Mol Cell Proteomics.* 13:2752-2764.
- Perez-Pomares, J.M., J.M. Gonzalez-Rosa, and R. Munoz-Chapuli. 2009. Building the vertebrate heart - an evolutionary approach to cardiac development. *Int J Dev Biol.* 53:1427-1443.
- Peters, N.S., C.R. Green, P.A. Poole-Wilson, and N.J. Severs. 1993. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts. *Circulation.* 88:864-875.
- Pitt, G.S., W. Dun, and P.A. Boyden. 2006. Remodeled cardiac calcium channels. *J Mol Cell Cardiol.* 41:373-388.
- Pizzuti, A., A. Sarkozy, A.L. Newton, E. Conti, E. Flex, M.C. Digilio, F. Amati, D. Gianni, C. Tandoi, B. Marino, M. Crossley, and B. Dallapiccola. 2003. Mutations of ZFPM2/FOG2 gene in sporadic cases of tetralogy of Fallot. *Hum Mutat.* 22:372-377.
- Poelzing, S., F.G. Akar, E. Baron, and D.S. Rosenbaum. 2004. Heterogeneous connexin43 expression produces electrophysiological heterogeneities across ventricular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H2001-2009.
- Poelzing, S., and D.S. Rosenbaum. 2004. Altered connexin43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 287:H1762-1770.
- Polakova, E., and E.A. Sobie. 2013. Alterations in T-tubule and dyad structure in heart disease: challenges and opportunities for computational analyses. *Cardiovasc Res.* 98:233-239.
- Ponikowski, P., S.D. Anker, K.F. AlHabib, M.R. Cowie, T.L. Force, S. Hu, T. Jaarsma, H. Krum, V. Rastogi, L.E. Rohde, U.C. Samal, H. Shimokawa, B.B. Siswanto, K. Sliwa, and G. Filippatos. 2014. Heart failure. Preventing disease and death worldwide. European Society of Cardiology.
- Porter, K.E., and N.A. Turner. 2009. Cardiac fibroblasts: at the heart of myocardial remodeling. *Pharmacol Ther.* 123:255-278.
- Pozzi, M., D.B. Trivedi, D. Kitchiner, and R.A. Arnold. 2000. Tetralogy of Fallot: what operation, at which age. *Eur J Cardiothorac Surg.* 17:631-636.
- Preminger, T.J., S.P. Sanders, M.E. van der Velde, A.R. Castaneda, and J.E. Lock. 1994. "Intramural" residual interventricular defects after repair of conotruncal malformations. *Circulation.* 89:236-242.
- Priori, S.G., C. Napolitano, M. Gasparini, C. Pappone, P. Della Bella, U. Giordano, R. Bloise, C. Giustetto, R. De Nardis, M. Grillo, E. Ronchetti, G. Faggiano, and J. Nastoli. 2002. Natural history of Brugada syndrome: insights for risk stratification and management. *Circulation.* 105:1342-1347.
- Protasi, F. 2002. Structural interaction between RYRs and DHPRs in calcium release units of cardiac and skeletal muscle cells. *Front Biosci.* 7:d650-658.

BIBLIOGRAPHIE

- Rampazzo, A., M. Calore, J. van Hengel, and F. van Roy. 2014. Intercalated discs and arrhythmogenic cardiomyopathy. *Circ Cardiovasc Genet.* 7:930-940.
- Ravens, U., and H.M. Himmel. 1999. Drugs preventing Na⁺ and Ca²⁺ overload. *Pharmacol Res.* 39:167-174.
- Reaume, A.G., P.A. de Sousa, S. Kulkarni, B.L. Langille, D. Zhu, T.C. Davies, S.C. Juneja, G.M. Kidder, and J. Rossant. 1995. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science.* 267:1831-1834.
- Reinecke, H., R. Studer, R. Vetter, J. Holtz, and H. Drexler. 1996. Cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res.* 31:48-54.
- Restivo, A., G. Piacentini, S. Placidi, C. Saffirio, and B. Marino. 2006. Cardiac outflow tract: a review of some embryogenetic aspects of the conotruncal region of the heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 288:936-943.
- Richard, S., F. Leclercq, S. Lemaire, C. Piot, and J. Nargeot. 1998. Ca²⁺ currents in compensated hypertrophy and heart failure. *Cardiovasc Res.* 37:300-311.
- Richards, M.A., J.D. Clarke, P. Saravanan, N. Voigt, D. Dobrev, D.A. Eisner, A.W. Trafford, and K.M. Dibb. 2011. Transverse tubules are a common feature in large mammalian atrial myocytes including human. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301:H1996-2005.
- Risebro, C.A., N. Smart, L. Dupays, R. Breckenridge, T.J. Mohun, and P.R. Riley. 2006. Hand1 regulates cardiomyocyte proliferation versus differentiation in the developing heart. *Development.* 133:4595-4606.
- Rook, M.B., A.C. van Ginneken, B. de Jonge, A. el Aoumari, D. Gros, and H.J. Jongsma. 1992. Differences in gap junction channels between cardiac myocytes, fibroblasts, and heterologous pairs. *Am J Physiol.* 263:C959-977.
- Rosenbaum, D.S., L.E. Jackson, J.M. Smith, H. Garan, J.N. Ruskin, and R.J. Cohen. 1994. Electrical alternans and vulnerability to ventricular arrhythmias. *N Engl J Med.* 330:235-241.
- Rosenbaum, D.S., and J. Jalife. 2001. Optical mapping of cardiac excitation and arrhythmias. Futura Publishing Compagny.
- Rousseau, E., and G. Meissner. 1989. Single cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-release channel: activation by caffeine. *Am J Physiol.* 256:H328-333.
- Ruwhof, C., and A. van der Laarse. 2000. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovasc Res.* 47:23-37.
- Ryder, K.O., S.M. Bryant, and G. Hart. 1993. Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation. *Cardiovasc Res.* 27:1278-1287.
- Sacks, H.S., and J.N. Fain. 2007. Human epicardial adipose tissue: a review. *Am Heart J.* 153:907-917.
- Saez, J.C., V.M. Berthoud, M.C. Branes, A.D. Martinez, and E.C. Beyer. 2003. Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev.* 83:1359-1400.
- Saguner, A.M., S. Ganahl, A. Kraus, S.H. Baldinger, D. Akdis, A.R. Saguner, T. Wolber, L.M. Haegeli, J. Steffel, N. Krasniqi, T.F. Luscher, F.C. Tanner, C. Brunckhorst, and F. Duru. 2015. Electrocardiographic features of disease progression in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *BMC Cardiovasc Disord.* 15:4.
- Sakakibara, Y., T. Furukawa, D.H. Singer, H. Jia, C.L. Backer, C.E. Arentzen, and J.A. Wasserstrom. 1993. Sodium current in isolated human ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 265:H1301-1309.
- Salama, G., and M. Morad. 1976. Merocyanine 540 as an optical probe of transmembrane electrical activity in the heart. *Science.* 191:485-487.
- Saliba, Z., J. Le Bidois, D. Sidi, J. Kachaner, and D. Bonnet. 1999. Prenatal detection of a tetralogy of Fallot with origin of the left pulmonary artery from the ascending aorta in a familial 22q11 microdeletion. *Prenat Diagn.* 19:260-262.
- Sande, J.B., I. Sjaastad, I.B. Hoen, J. Bokenes, T. Tonnessen, E. Holt, P.K. Lunde, and G. Christensen. 2002. Reduced level of serine(16) phosphorylated phospholamban in the failing rat myocardium: a major contributor to reduced SERCA2 activity. *Cardiovasc Res.* 53:382-391.

- Sanguinetti, M.C., and N.K. Jurkiewicz. 1990. Two components of cardiac delayed rectifier K⁺ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol.* 96:195-215.
- Santamore, W.P., and L.J. Dell'Italia. 1998. Ventricular interdependence: significant left ventricular contributions to right ventricular systolic function. *Prog Cardiovasc Dis.* 40:289-308.
- Sarubbi, B., G. Pacileo, V. Ducceschi, M.G. Russo, C. Iacono, C. Pisacane, A. Iacono, and R. Calabro. 1999. Arrhythmogenic substrate in young patients with repaired tetralogy of Fallot: role of an abnormal ventricular repolarization. *Int J Cardiol.* 72:73-82.
- Sato, P.Y., H. Musa, W. Coombs, G. Guerrero-Serna, G.A. Patino, S.M. Taffet, L.L. Isom, and M. Delmar. 2009. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. *Circ Res.* 105:523-526.
- Saygi, M., S. Haydin, A. Guzeltas, E. Odemis, and M. Yeniterzi. 2014. A rare congenital cardiac anomaly in adulthood: tetralogy of Fallot with absent pulmonary valve syndrome. *World J Pediatr Congenit Heart Surg.* 5:330-333.
- Schmidt, U., R.J. Hajjar, P.A. Helm, C.S. Kim, A.A. Doye, and J.K. Gwathmey. 1998. Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 30:1929-1937.
- Schultz, A.H., and G. Wernovsky. 2005. Late outcomes in patients with surgically treated congenital heart disease. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu:*145-156.
- Scriven, D.R., P. Asghari, and E.D. Moore. 2013. Microarchitecture of the dyad. *Cardiovasc Res.* 98:169-176.
- Severs, N.J., A.F. Bruce, E. Dupont, and S. Rothery. 2008. Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium. *Cardiovasc Res.* 80:9-19.
- Sfyridis, P.G., G.V. Kirvassilis, J.K. Papagiannis, D.P. Avramidis, C.G. Ieromonachos, P.N. Zavaropoulos, and G.E. Sarris. 2013. Preservation of right ventricular structure and function following transatrial-transpulmonary repair of tetralogy of Fallot. *Eur J Cardiothorac Surg.* 43:336-342.
- Shanmugam, N., J. Yap, R.S. Tan, T.T. Le, F. Gao, J.X. Chan, D. Chong, K.L. Ho, B.Y. Tan, C.K. Ching, W.S. Teo, J.L. Tan, and R. Liew. 2013. Fragmented QRS complexes predict right ventricular dysfunction and outflow tract aneurysms in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol.* 167:1366-1372.
- Soeller, C., and M.B. Cannell. 1999. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res.* 84:266-275.
- Solan, J.L., and P.D. Lampe. 2009. Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J.* 419:261-272.
- Song, L.S., E.A. Sobie, S. McCulle, W.J. Lederer, C.W. Balke, and H. Cheng. 2006. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4305-4310.
- Spach, M.S. 1983. The discontinuous nature of electrical propagation in cardiac muscle. Consideration of a quantitative model incorporating the membrane ionic properties and structural complexities. The ALZA distinguished lecture. *Ann Biomed Eng.* 11:209-261.
- Spector, P. 2013. Principles of cardiac electric propagation and their implications for re-entrant arrhythmias. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 6:655-661.
- Spotnitz, H.M. 2000. Macro design, structure, and mechanics of the left ventricle. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 119:1053-1077.
- Srivastava, D., P. Cserjesi, and E.N. Olson. 1995. A subclass of bHLH proteins required for cardiac morphogenesis. *Science.* 270:1995-1999.
- Srivastava, D., T. Thomas, Q. Lin, M.L. Kirby, D. Brown, and E.N. Olson. 1997. Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet.* 16:154-160.
- Stewart, S., K. MacIntyre, D.J. Hole, S. Capewell, and J.J. McMurray. 2001. More 'malignant' than cancer? Five-year survival following a first admission for heart failure. *Eur J Heart Fail.* 3:315-322.

BIBLIOGRAPHIE

- Stuyvers, B.D., W. Dun, S. Matkovich, V. Sorrentino, P.A. Boyden, and H.E. ter Keurs. 2005. Ca²⁺ sparks and waves in canine purkinje cells: a triple layered system of Ca²⁺ activation. *Circ Res.* 97:35-43.
- Sun, X.H., F. Protasi, M. Takahashi, H. Takeshima, D.G. Ferguson, and C. Franzini-Armstrong. 1995. Molecular architecture of membranes involved in excitation-contraction coupling of cardiac muscle. *J Cell Biol.* 129:659-671.
- Sung, R.J., W.A. Shapiro, E.N. Shen, F. Morady, and J. Davis. 1983. Effects of verapamil on ventricular tachycardias possibly caused by reentry, automaticity, and triggered activity. *J Clin Invest.* 72:350-360.
- Svensson, E.C., G.S. Huggins, H. Lin, C. Clendenin, F. Jiang, R. Tufts, F.B. Dardik, and J.M. Leiden. 2000. A syndrome of tricuspid atresia in mice with a targeted mutation of the gene encoding Fog-2. *Nat Genet.* 25:353-356.
- Swift, L.M., H. Asfour, N.G. Posnack, A. Arutunyan, M.W. Kay, and N. Sarvazyan. 2012. Properties of blebbistatin for cardiac optical mapping and other imaging applications. *Pflugers Arch.* 464:503-512.
- Szentadrassy, N., T. Banyasz, T. Biro, G. Szabo, B.I. Toth, J. Magyar, J. Lazar, A. Varro, L. Kovacs, and P.P. Nanasi. 2005. Apico-basal inhomogeneity in distribution of ion channels in canine and human ventricular myocardium. *Cardiovasc Res.* 65:851-860.
- Takebayashi, S., Y. Li, T. Kaku, S. Inagaki, Y. Hashimoto, K. Kimura, S. Miyamoto, T. Hadama, and K. Ono. 2006. Remodeling excitation-contraction coupling of hypertrophied ventricular myocytes is dependent on T-type calcium channels expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 345:766-773.
- Tamesberger, M.I., E. Lechner, R. Mair, A. Hofer, E. Sames-Dolzer, and G. Tulzer. 2008. Early primary repair of tetralogy of fallot in neonates and infants less than four months of age. *Ann Thorac Surg.* 86:1928-1935.
- Tarroni, P., D. Rossi, A. Conti, and V. Sorrentino. 1997. Expression of the ryanodine receptor type 3 calcium release channel during development and differentiation of mammalian skeletal muscle cells. *J Biol Chem.* 272:19808-19813.
- Taylor, R.R., and E.J. Halliday. 1965. Beta-adrenergic blockade in the treatment of exercise-induced paroxysmal ventricular tachycardia. *Circulation.* 32:778-781.
- Thambo, J.-B., P. Dos Santos, M. De Guillebon, F. Roubertie, L. Labrousse, F. Sacher, X. Iriart, S. Lafitte, S. Ploux, P. Jais, X. Roques, M. Haissaguerre, P. Ritter, J. Clementy, S.M. Narayan, and P. Bordachar. 2010. Biventricular stimulation improves right and left ventricular function after tetralogy of Fallot repair: Acute animal and clinical studies. *Heart Rhythm.* 7:344-350.
- Thambo, J.B., F. Roubertie, M. De Guillebon, L. Labrousse, X. Iriart, H. Ntsinjana, S. Lafitte, S. Ploux, M. Haissaguerre, X. Roques, P. Dos Santos, and P. Bordachar. 2012. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol.* 154:38-42.
- Therrien, J., S.C. Siu, L. Harris, A. Dore, K. Niwa, J. Janousek, W.G. Williams, G. Webb, and M.A. Gatzoulis. 2001. Impact of pulmonary valve replacement on arrhythmia propensity late after repair of tetralogy of Fallot. *Circulation.* 103:2489-2494.
- Thiene, G., D. Corrado, and C. Basso. 2007. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy/dysplasia. *Orphanet J Rare Dis.* 2:45.
- Tomaselli, G.F., and D.P. Zipes. 2004. What causes sudden death in heart failure? *Circ Res.* 95:754-763.
- Trinick, J. 1996. Titin as a scaffold and spring. Cytoskeleton. *Curr Biol.* 6:258-260.
- Uzzaman, M., H. Honjo, Y. Takagishi, L. Emdad, A.I. Magee, N.J. Severs, and I. Kodama. 2000. Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ Res.* 86:871-878.
- Vaidya, D., H.S. Tamaddon, C.W. Lo, S.M. Taffet, M. Delmar, G.E. Morley, and J. Jalife. 2001. Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development. *Circ Res.* 88:1196-1202.

- Valderrabano, M., M.H. Lee, T. Ohara, A.C. Lai, M.C. Fishbein, S.F. Lin, H.S. Karagueuzian, and P.S. Chen. 2001. Dynamics of intramural and transmural reentry during ventricular fibrillation in isolated swine ventricles. *Circ Res.* 88:839-848.
- Valdivia, C.R., W.W. Chu, J. Pu, J.D. Foell, R.A. Haworth, M.R. Wolff, T.J. Kamp, and J.C. Makielski. 2005. Increased late sodium current in myocytes from a canine heart failure model and from failing human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 38:475-483.
- van Dalen, B.M., F. Kauer, W.B. Vletter, O.I. Soliman, H.B. van der Zwaan, F.J. Ten Cate, and M.L. Geleijnse. 2010. Influence of cardiac shape on left ventricular twist. *J Appl Physiol (1985).* 108:146-151.
- Vassort, G., K. Talavera, and J.L. Alvarez. 2006. Role of T-type Ca^{2+} channels in the heart. *Cell Calcium.* 40:205-220.
- Verkerk, A.O., M.W. Veldkamp, and A.C. van Ginneken. 2001. Cl current blockade reduces triggered activity based on delayed afterdepolarisations. *Neth Heart J.* 9:172-176.
- Vicente-Manzanares, M., X. Ma, R.S. Adelstein, and A.R. Horwitz. 2009. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:778-790.
- Villafane, J., J.A. Feinstein, K.J. Jenkins, R.N. Vincent, E.P. Walsh, A.M. Dubin, T. Geva, J.A. Towbin, M.S. Cohen, C. Fraser, J. Dearani, D. Rosenthal, B. Kaufman, T.P. Graham, Jr., C. Adult, and A.C.o.C. Pediatric Cardiology Section. 2013. Hot topics in tetralogy of Fallot. *J Am Coll Cardiol.* 62:2155-2166.
- Vincentz, J.W., R.M. Barnes, and A.B. Firulli. 2011. Hand factors as regulators of cardiac morphogenesis and implications for congenital heart defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 91:485-494.
- Vogel, M., J. Sponring, S. Cullen, J.E. Deanfield, and A.N. Redington. 2001. Regional wall motion and abnormalities of electrical depolarization and repolarization in patients after surgical repair of tetralogy of Fallot. *Circulation.* 103:1669-1673.
- Volders, P.G., A. Kulcsar, M.A. Vos, K.R. Sipido, H.J. Wellens, R. Lazzara, and B. Szabo. 1997. Similarities between early and delayed afterdepolarizations induced by isoproterenol in canine ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 34:348-359.
- Volders, P.G., K.R. Sipido, E. Carmeliet, R.L. Spatjens, H.J. Wellens, and M.A. Vos. 1999. Repolarizing K^{+} currents ITO1 and IKs are larger in right than left canine ventricular midmyocardium. *Circulation.* 99:206-210.
- Wald, R.M., I. Haber, R. Wald, A.M. Valente, A.J. Powell, and T. Geva. 2009. Effects of regional dysfunction and late gadolinium enhancement on global right ventricular function and exercise capacity in patients with repaired tetralogy of Fallot. *Circulation.* 119:1370-1377.
- Wald, R.M., A.M. Valente, and A. Marelli. 2015. Heart failure in adult congenital heart disease: Emerging concepts with a focus on tetralogy of Fallot. *Trends Cardiovasc Med.* 25:422-432.
- Walsh, E.P. 2014. Sudden death in adult congenital heart disease: risk stratification in 2014. *Heart Rhythm.* 11:1735-1742.
- Walsh, K.B., and J. Zhang. 2008. Neonatal rat cardiac fibroblasts express three types of voltage-gated K^{+} channels: regulation of a transient outward current by protein kinase C. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294:H1010-1017.
- Walton, R.D., D. Benoist, C.J. Hyatt, S.H. Gilbert, E. White, and O. Bernus. 2010. Dual excitation wavelength epifluorescence imaging of transmural electrophysiological properties in intact hearts. *Heart Rhythm.* 7:1843-1849.
- Ward, C., H. Stadt, M. Hutson, and M.L. Kirby. 2005. Ablation of the secondary heart field leads to tetralogy of Fallot and pulmonary atresia. *Dev Biol.* 284:72-83.
- Watanabe, T., L.M. Delbridge, J.O. Bustamante, and T.F. McDonald. 1983. Heterogeneity of the action potential in isolated rat ventricular myocytes and tissue. *Circ Res.* 52:280-290.
- Watanabe, T., P.M. Rautaharju, and T.F. McDonald. 1985. Ventricular action potentials, ventricular extracellular potentials, and the ECG of guinea pig. *Circ Res.* 57:362-373.

BIBLIOGRAPHIE

- Weber, C.R., V. Piacentino, 3rd, K.S. Ginsburg, S.R. Houser, and D.M. Bers. 2002. Na(+)-Ca(2+) exchange current and submembrane [Ca(2+)] during the cardiac action potential. *Circ Res.* 90:182-189.
- Weber, K.T., and C.G. Brilla. 1991. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation.* 83:1849-1865.
- Winegrad, S. 2005. Cardiac myosin binding protein C: modulator of contractility. *Adv Exp Med Biol.* 565:269-281; discussion 281-262, 405-215.
- Witcher, D.R., R.J. Kovacs, H. Schulman, D.C. Cefali, and L.R. Jones. 1991. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J Biol Chem.* 266:11144-11152.
- Workman, A.J., G.E. Marshall, A.C. Rankin, G.L. Smith, and J. Dempster. 2012. Transient outward K+ current reduction prolongs action potentials and promotes afterdepolarisations: a dynamic-clamp study in human and rabbit cardiac atrial myocytes. *J Physiol.* 590:4289-4305.
- Wu, D.M., M. Jiang, M. Zhang, X.S. Liu, Y.V. Korolkova, and G.N. Tseng. 2006. KCNE2 is colocalized with KCNQ1 and KCNE1 in cardiac myocytes and may function as a negative modulator of I(Ks) current amplitude in the heart. *Heart Rhythm.* 3:1469-1480.
- Xu, H., W. Guo, and J.M. Nerbonne. 1999. Four kinetically distinct depolarization-activated K+ currents in adult mouse ventricular myocytes. *J Gen Physiol.* 113:661-678.
- Xu, H., M. Morishima, J.N. Wylie, R.J. Schwartz, B.G. Bruneau, E.A. Lindsay, and A. Baldini. 2004. Tbx1 has a dual role in the morphogenesis of the cardiac outflow tract. *Development.* 131:3217-3227.
- Yamamoto, K., Q.N. Dang, S.P. Kennedy, R. Osathanondh, R.A. Kelly, and R.T. Lee. 1999. Induction of tenascin-C in cardiac myocytes by mechanical deformation. Role of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry.* 274:21840-21846.
- Yan, G.X., and C. Antzelevitch. 1999. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST-segment elevation. *Circulation.* 100:1660-1666.
- Yano, M., K. Ono, T. Ohkusa, M. Suetsugu, M. Kohno, T. Hisaoka, S. Kobayashi, Y. Hisamatsu, T. Yamamoto, M. Kohno, N. Noguchi, S. Takasawa, H. Okamoto, and M. Matsuzaki. 2000. Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca(2+) leak through ryanodine receptor in heart failure. *Circulation.* 102:2131-2136.
- Yoshimura, M., H. Yasue, K. Okumura, H. Ogawa, M. Jougasaki, M. Mukoyama, K. Nakao, and H. Imura. 1993. Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation.* 87:464-469.
- Yu, L., W.P. Ruifrok, M. Meissner, E.M. Bos, H. van Goor, B. Sanjabi, P. van der Harst, B. Pitt, I.J. Goldstein, J.A. Koerts, D.J. van Veldhuisen, R.A. Bank, W.H. van Gilst, H.H. Sillje, and R.A. de Boer. 2013. Genetic and pharmacological inhibition of galectin-3 prevents cardiac remodeling by interfering with myocardial fibrogenesis. *Circulation. Heart failure.* 6:107-117.
- Zarain-Herzberg, A., N. Afzal, V. Elimban, and N.S. Dhalla. 1996. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 163-164:285-290.
- Zdradzinski, M.J., A.M. Qureshi, R. Stewart, G. Pettersson, and R.A. Krasuski. 2014. Comparison of long-term postoperative sequelae in patients with tetralogy of Fallot versus isolated pulmonic stenosis. *Am J Cardiol.* 114:300-304.
- Zeltser, I., J.W. Gaynor, M. Petko, R.J. Myung, M. Birbach, R. Waibel, R.F. Ittenbach, R.E. Tanel, V.L. Vetter, and L.A. Rhodes. 2005. The roles of chronic pressure and volume overload states in induction of arrhythmias: an animal model of physiologic sequelae after repair of tetralogy of Fallot. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery.* 130:1542-1548.
- Zeppenfeld, K., M.J. Schalij, M.M. Bartelings, U.B. Tedrow, B.A. Koplan, K. Soejima, and W.G. Stevenson. 2007. Catheter ablation of ventricular tachycardia after repair of congenital heart disease: electroanatomic identification of the critical right ventricular isthmus. *Circulation.* 116:2241-2252.

- Zicha, S., M. Fernandez-Velasco, G. Lonardo, N. L'Heureux, and S. Nattel. 2005. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model. *Cardiovasc Res.* 66:472-481.
- Zile, M.R., and D. Gregg. 2016. Is Biventricular Fibrosis the Mediator of Late Complications in Tetralogy of Fallot? *JACC Cardiovasc Imaging.* 9:11-13.
- Ziman, A.P., N.L. Gomez-Viquez, R.J. Bloch, and W.J. Lederer. 2010. Excitation-contraction coupling changes during postnatal cardiac development. *J Mol Cell Cardiol.* 48:379-386.
- Zipes, D.P., P.R. Foster, P.J. Troup, and D.H. Pedersen. 1979. Atrial induction of ventricular tachycardia: reentry versus triggered automaticity. *Am J Cardiol.* 44:1-8.
- Zygmunt, A.C., and W.R. Gibbons. 1991. Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes. *Circ Res.* 68:424-437.

ANNEXES

ANNEXES

Article 3 : Identification of region-specific myocardial gene expression patterns in a chronic swine model of repaired Tetralogy of Fallot

Charron, S., Roubertie, F., Benoist, D., **Dubés, V.**, Gilbert, S.H., Constantin, M., Vieillot, D., Elbes, D., Quesson, B., Bordachar, P., et al. (2015). Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot. *PLoS One* 10, e0134146.

Cette étude porte sur le ciblage à haut débit de l'expression de 7600 gènes permettant ainsi de déterminer leur contribution au remodelage décrit dans les cœurs de cochons rTOF. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec Mme Sabine CHARRON et le Docteur Caroline ROORYCK-THAMBO.

Dans ce travail, en utilisant les méthodes de microarray et de RT-PCR sur des échantillons provenant des régions sub-épicaudiques et sub-endocardiques des deux ventricules, nous avons pu caractériser pour la première fois le profil transcriptomique d'un modèle de cochon rTOF en comparaison à des animaux sains.

Les variations significatives des profils d'expression touchent essentiellement la région sub-endocardique du VD. Ainsi, le remodelage électrophysiologique et structurel arythmogène observé dans le VG ne serait pas lié à ce stade à des changements de niveau d'expression de gènes, mais plutôt à des facteurs externes comme l'interdépendance ventriculaire ou l'hyperstimulation neuro-hormonale.

Les principaux résultats de cette étude indiquent que plusieurs classes de gènes exprimés au sein du VD sub-endocardique sont altérés tels que les gènes codant pour des marqueurs d'IC, des protéines intervenant dans la gestion du Ca^{2+} et les protéines du cytosquelette.

RESEARCH ARTICLE

Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot

Sabine Charron^{1,2}, François Roubertie^{1,2,3}, David Benoist^{1,2}, Virginie Dubes^{1,2}, Stephen H. Gilbert^{1,2,4}, Marion Constantin^{1,2}, Delphine Vieillot⁵, Delphine Elbes^{1,2,6}, Bruno Quesson^{1,2}, Pierre Bordachar^{1,2,3}, Michel Haissaguerre^{1,2,3}, Olivier Bernus^{1,2}, Jean-Benoit Thambo^{1,2,3}, Caroline Rooryck^{1,3,7*}

1 L'Institut de Rythmologie et Modélisation Cardiaque LIRYC, Université de Bordeaux, Pessac, France, **2** Inserm U1045 CRCTB, Université de Bordeaux, Bordeaux, France, **3** Hôpital cardiologique Haut-Lévêque, CHU de Bordeaux, Pessac, France, **4** Max Delbrück Center for Molecular Medicine, Berlin, Germany, **5** Plateforme Technologique d'Innovation Biomédicale, Université de Bordeaux, Pessac, France, **6** University of Oxford, Institute of Biomedical Engineering, Oxford, United-Kingdom, **7** Laboratoire Maladies Rares: Génétique et Métabolisme (MRGM), EA 4576, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

* caroline.rooryck-thambo@chu-bordeaux.fr



OPEN ACCESS

Citation: Charron S, Roubertie F, Benoist D, Dubes V, Gilbert SH, Constantin M, et al. (2015) Identification of Region-Specific Myocardial Gene Expression Patterns in a Chronic Swine Model of Repaired Tetralogy of Fallot. PLoS ONE 10(8): e0134146. doi:10.1371/journal.pone.0134146

Editor: Robert W Dettman, Northwestern University, UNITED STATES

Received: February 25, 2015

Accepted: July 6, 2015

Published: August 7, 2015

Copyright: © 2015 Charron et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

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

Abstract

Surgical repair of Tetralogy of Fallot (TOF) is highly successful but may be complicated in adulthood by arrhythmias, sudden death, and right ventricular or biventricular dysfunction. To better understand the molecular and cellular mechanisms of these delayed cardiac events, a chronic animal model of postoperative TOF was studied using microarrays to perform cardiac transcriptomic studies. The experimental study included 12 piglets (7 rTOF and 5 controls) that underwent surgery at age 2 months and were further studied after 23 (+/- 1) weeks of postoperative recovery. Two distinct regions (endocardium and epicardium) from both ventricles were analyzed. Expression levels from each localization were compared in order to decipher mechanisms and signaling pathways leading to ventricular dysfunction and arrhythmias in surgically repaired TOF. Several genes were confirmed to participate in ventricular remodeling and cardiac failure and some new candidate genes were described. In particular, these data pointed out *FRZB* as a heart failure marker. Moreover, calcium handling and contractile function genes (*SLN*, *ACTC1*, *PLCD4*, *PLCZ*), potential arrhythmia-related genes (*MYO5B*, *KCNA5*), and cytoskeleton and cellular organization-related genes (*XIRP2*, *COL8A1*, *KCNA6*) were among the most deregulated genes in rTOF ventricles. To our knowledge, this is the first comprehensive report on global gene expression profiling in the heart of a long-term swine model of repaired TOF.

Introduction

Tetralogy of Fallot (TOF) is the most frequent cyanotic congenital heart disease in humans with an incidence of 1/3600 live births [1]. Surgical early primary repair is highly successful

and the population of adults with repaired Tetralogy of Fallot is increasing rapidly. However, the long-term outcome of these patients may be complicated by right ventricular [RV] or biventricular dysfunction and by sudden cardiac death (around 5%). The incompletely understood mechanisms of these delayed events may partially be due to surgically-induced permanent right bundle branch block (BBB) and ventricular dyssynchrony [2,3,4]. Unlike left ventricular failure, RV failure is poorly understood and its management remains largely empirical. In particular, the molecular mechanisms underlying different stages of ventricular remodeling and its progression towards heart failure (HF) remain obscure. Indeed, a recent position paper from the ESC working Group on Myocardial Function have emphasized the interest of working on the functional and molecular changes occurring in the right ventricle [5].

In order to better understand the implication of prolonged dyssynchrony, we established and characterized a chronic large animal model that mimicked essential parameters of postoperative TOF [6]. This model represents a reliable long-term swine model of RV dysfunction and dyssynchrony, with echocardiographic measurements comparable to adult patients with early surgical repaired TOF. Indeed, large animal models have a closer physiology to humans than small mammal models and are more appropriate to study the pathophysiological changes associated with ventricular remodeling.

Moreover, in the past decade, the completion of *Sus Scrofa* genome sequencing (Sscrofa10.2, INSDC Assembly, Aug 2011) led to the development of commercially available pig cDNA microarrays that could be used to detect changes in swine genes expression.

In the present study, we aimed at deciphering the sequence of molecular events and pathways leading to the progression of ventricular dysfunction and arrhythmias, by studying gene expression profiles of repaired Fallot (rTOF) pigs' hearts compared to control animals (sham-operated), in four different localizations of the heart (epicardium and endocardium of right and left ventricles), by a whole genome approach. Some transcripts were selected to verify the accuracy and reproducibility of the microarray data by real-time qRT-PCR.

Materials and Methods

The experimental protocol followed the European rules for animal experimentation (European legislation 2010/63/UE—2010) which was implemented under French legislation from February 2013 and following which all animal experimental protocols, including the present study, at our Institution were reviewed and approved by the local Ethics Committee "Comité d'Ethique en Expérimentation Animale de Bordeaux—CEE50. The experimental protocols were in compliance with the Guiding Principles in the Use and Care of Animals published by the National Institutes of Health (NIH Publication No. 85–23, Revised 1996).

rTOF swine model

The experimental study included 12 piglets (7 rTOF and 5 controls), aged three months and weighing less than 12 kg, at the time of surgery. The animal model was established as previously described [6]. Briefly, after left thoracotomy of seven piglets, the RV outflow tract was partially occluded with a clamp and incised longitudinally across the pulmonic valve annulus. The operation was designed to cause RV volume overload from valvular regurgitation by excision of two pulmonic valve leaflets, RV pressure overload by a loose tape partially occluding the pulmonary artery, and RV outflow tract scar around the patch placed to close the RV incision. Five piglets were sham operated to serve as controls. After the procedure was completed, the animals were extubated and received supplemental oxygen and analgesia as needed, before their transfer to a long-term postoperative care facility. After intervention, qualitative cardiac

evaluation of the pigs was performed by echocardiogram and color Doppler in order to confirm the pulmonary regurgitation in the rTOF pigs.

After 23 (+/- 1) weeks of postoperative recovery, cardiac function was assessed in anesthetized pigs (isoflurane 2%, Vibrac) by cardiac magnetic resonance in a Siemens Magnetom Avanto 1.5T MRI scanner (Erlangen, Germany). Animals were euthanized, their hearts excised and washed in ice-cold cardioplegic solution to remove any residual blood.

Tissue collection and RNA extraction

Myocardial samples were dissected out and immediately frozen into liquid nitrogen. Biopsies were then stored at -80°C until RNA extraction. Total RNA was extracted from tissues using QIAzol reagent (Qiagen, USA). RNA was purified and DNase treated using the QIAGEN RNeasy Kit. RNA purity and integrity, were assessed both by spectrophotometry (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies) and nanoelectrophoresis (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies).

Microarray Hybridization and scanning

cDNA was synthesized from 200 ng of total-RNA using the direct cDNA Labeling System. Aminoallyl-cRNA was synthesized from cDNA using the Superscript Indirect cDNA Labeling System. The cRNA was purified using RNeasy QIAGEN RNeasy Kit.

Labeling and hybridization of the cRNA was performed with Agilent Whole Porcine Genome Oligo (4 × 44 K) Microarrays (one-color platform), according to the manufacturer's protocols. The slides were scanned and analyzed using the histogram method with default settings in an Agilent G2565C Microarray Scanner System with SureScan Technology.

Annotation of the porcine microarray

Among the 43,603 probes present on the Porcine 44K Agilent microarray (V2), only 15,458 of these were annotated with HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) gene symbols [7], corresponding to about 7600 genes. This incomplete annotation was probably due to the presence of former ESTs (Expressed Sequence Tags) that no longer belong to *Sus Scrofa* after the completion of the pig genome sequencing project. More probes were annotated using GeneBank and Basic local Alignment Search tool program (BLAST, NCBI).

Microarray Data Analysis

Hierarchical clustering of the significantly differentially expressed (DE) genes from microarray data was carried out by the Genespring software (Agilent Technologies), with a p-value corrected by Benjamini Hochberg False Discovery Rate (FDR). Different softwares were used to interpret the biological functions and canonical pathways of the gene lists: Visualization and Integrated Discovery Online platform (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) [8], using Gene ontology (GO) terms and the Database for Annotation, with a threshold of a minimum three genes annotated at each node, Panther Pathway (<http://www.pantherdb.org/pathway/>) and Ingenuity Pathway Analysis (IPA, <http://www.ingenuity.com>)

Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR)

In order to confirm the reliability of the expression profile from the microarray analyses, the expression level of some genes was assessed by real-time RT-qPCR.

Sequences for primers were obtained from Ensembl Genome Browser. Primers were designed using Primer designing tool (NCBI) and synthesized at Sigma Aldrich. 1µg of RNA

was reversed transcribed using a cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed in a 25 μ L reaction volume (2 μ L cDNA, 12.5 μ L of SYBR Premix (BIO-RAD), a volume of 10 μ M upstream and downstream primers respectively, and added ddH₂O to 25 μ L) on the BIO-RAD C 100 Touch Thermal Cycler / CFX96 Real time System. Real-time PCR conditions were as follows: 3 min at 95.0°C, 40 cycles of denaturation at 95°C for 30 s followed by 30 s annealing and elongation at 60°C. Efficiency of primer pairs was previously evaluated. Melting curves were obtained at the end of each run to confirm a single PCR product. All samples were run in triplicate. Non-template controls were included in each run to exclude contamination and nonspecific amplification. Expression levels of samples were normalized by using a normalization factor calculated by the software CFX Manager (BIO-RAD). This normalization factor was calculated based on RT-qPCR results for two selected reference genes, *HPRT1* and *GUSB*. This allowed quantification of the target gene in one sample relative to that in another (the calibrator) using the “ $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method” of calculating fold changes in gene expression.

Results

Upon cardiac magnetic resonance examination at 23 ± 1 weeks, Fallot pigs presented with significantly decreased RV ejection fraction and increased RV end-diastolic volume compared to controls indicating RV dysfunction and RV dilation respectively ([S1 Fig](#)).

We first performed microarray experiments on myocardial biopsies from the right ventricle (endocardium and epicardium separately), because we expected more changes in this particular region with an animal model of right ventricular dysfunction. We observed the biggest list of statistically significant DE genes in the endocardium of the right ventricle and focused on the exploration of these genes. We then explored the left ventricle (endocardium and epicardium).

Microarray Profiling of the endocardium of the right ventricle

Out of the 43,603 probes represented on the Sus Scrofa microarray (Agilent), 153 probes were significantly different in rTOF pigs versus controls, after preprocessing and statistical analysis (fold change >1.2 ; $p < 0.05$) ([Fig 1](#)). These 153 probes correspond to 69 annotated genes with 54 HUGO genes (other than LOC) ([S1 Table](#)) implicated in different processes, notably heart failure markers genes, calcium handling and contractile function-related genes, electrophysiology and arrhythmia-related genes, cytoskeleton/cellular organization-related genes, that may be of particular interest for our model.

The biological processes depicting genes that were deregulated in rTOF hearts are shown in [Fig 2](#). “Metabolic process” (GO:0008152) and “Cellular process” (GO:0009987) are the most represented processes.

Functional Pathway and Network Analysis

To investigate the interconnectivity of the differentially regulated genes with other gene products, pathways, and biological processes, molecular networks were formed with IPA software. These networks include genes from our transcriptomic data and their interactions with genes that are biologically relevant to the pathway, coding for hub molecules not altered in our experiments. [Fig 3](#) shows the 22 most significant canonical pathways related to the 54 DE HUGO genes. Among these signaling cascades, the first is the NRF2-mediated Oxidative Stress Response that triggers apoptosis and necrosis. Then, the gap junction signaling related to electrical impulse propagation, the actin cytoskeleton signaling mediating cell motility and cell reshaping in response to extracellular stimuli, are the canonical pathways mostly involved.

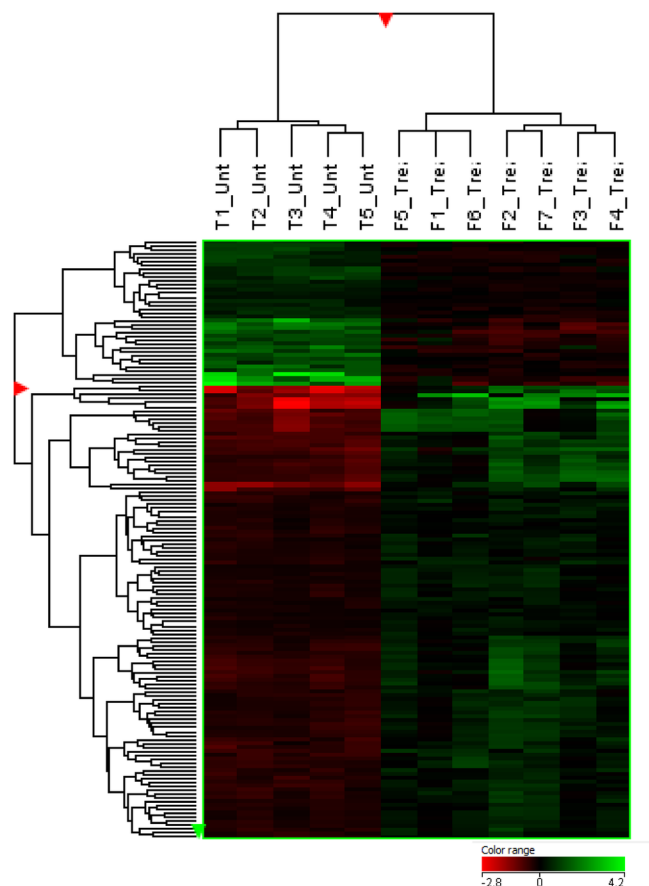


Fig 1. Heatmap displaying the 153 most differentially expressed probes ($p < 0.05$ $FC > 1.2$) in the RV Endocardium of 5 controls pigs (T1 to T5) and of 7 rTOF pigs (F1 to F7). The red and green colors indicate relative transcript abundance (red = overexpressed, green = downregulated). The columns represent the 12 samples while the rows correspond to the 153 probes. Samples were classified using hierarchical clustering, according to similarity in change in relative transcript abundance.

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g001

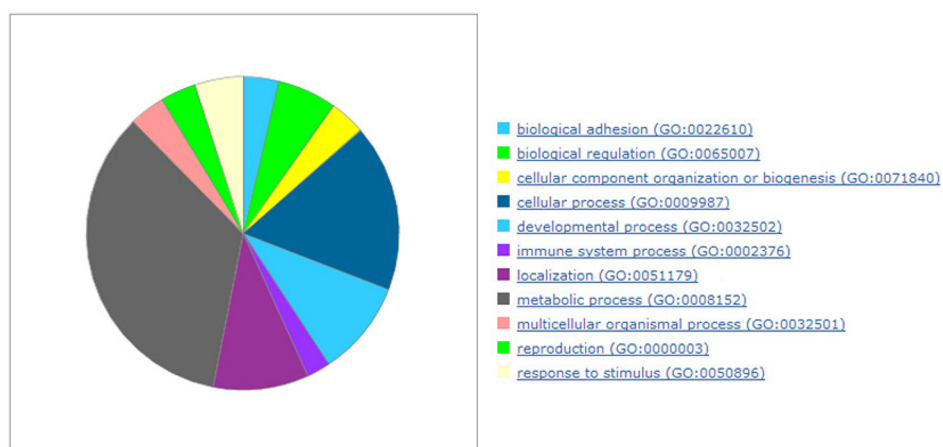


Fig 2. The significant gene ontology biological processes in the RV Endocardium.

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g002

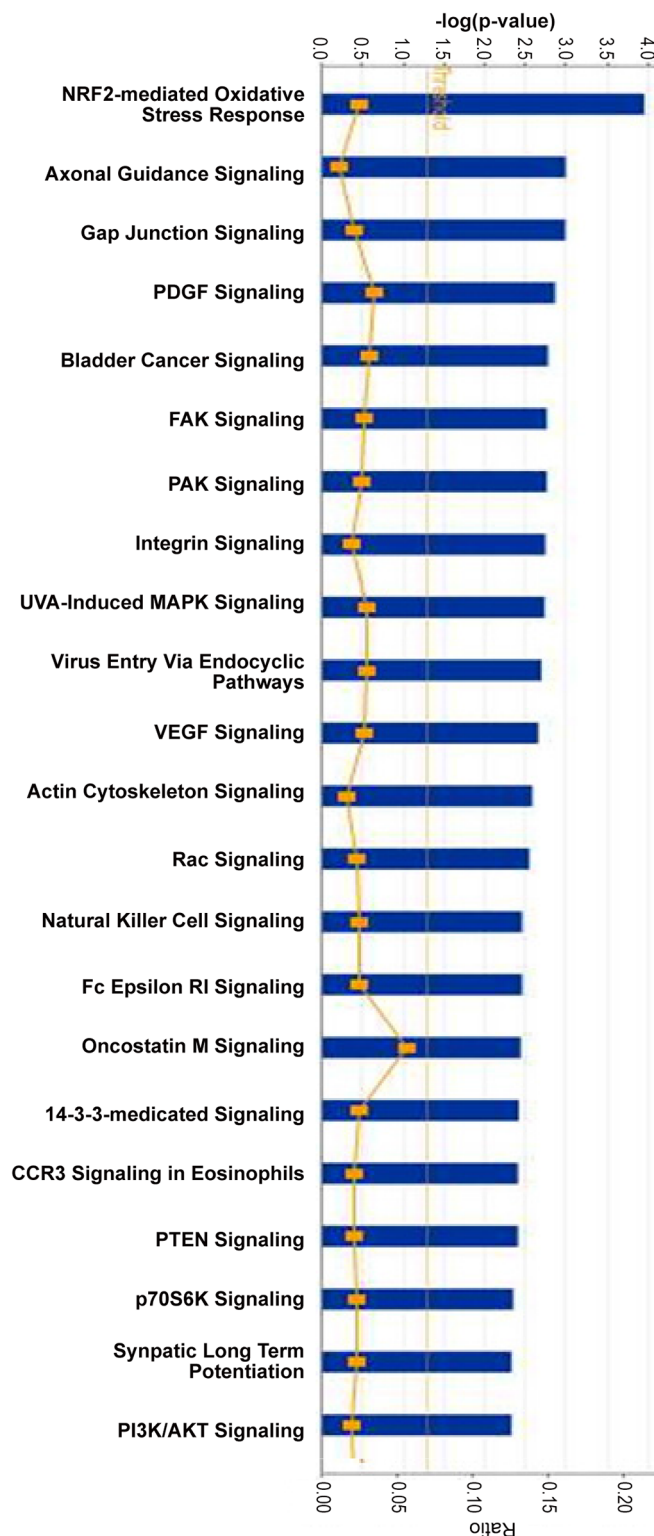


Fig 3. Functional categorization analysis of the most significant pathways represented in the microarray-generated list of the 54 most differentially expressed genes (Ingenuity software) in the RV Endocardium of rTOF pigs. The p-values (blue bars) were calculated using the right-tailed Fisher's exact test. The threshold (yellow line) is set to a p-value = 0.05. The ratios (yellow dots and curve) represent the number of molecules of the experiment related to the number of total molecules involved in the pathways.

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g003

Other signaling pathways are linked to angiogenesis (PDGF and VEGF signaling), and to cellular adhesion (FAK signaling). The genes involved in these canonical pathways are listed in [S2 Table](#).

The top 4 networks among the genes most differentially expressed are represented in [Fig 4A](#). Each network was identified based on a numerical rank score according to the degree of relevance of the network to the molecules of our genes set and based on the hypergeometric distribution calculated as $-\log$ (Fisher's exact test result). Genes involved in "Molecular transport, Cellular Growth and Proliferation" and "Endocrine system development and Function, Lipid Metabolism" were significantly overrepresented among differentially expressed genes. [Fig 4B](#) displays the network #2 with the highest number of genes of interest. In this network, ERK-PKC-MAPK are central hub molecules.

Altered expression of genes implicated in different processes

Specifically, relative to controls, rTOF pigs changed expression of heart failure markers genes—Secreted frizzled-related protein 1 (*FRZB*), calcium handling and contractile function-related genes—Sarcolipin (*SLN*), Alpha cardiac actin (*ACTC1*), Calsequestrin (*CASQ1*), Troponin (*TNNT1*), Myotilin (*MYOT*), Phospholipase C Z (*PLCZ*), Phospholipase C D4 (*PLCD4*), electrophysiology and arrhythmia-related genes—Myosin 5B (*MYO5B*), Four and a half LIM domains protein 1 (*FHL1C*), Collagen type VIII (*COL8A1*), Potassium voltage-gated channel subfamily A member 6 (*KCNA6*) and Cytoskeleton/Cellular organization-related genes—Xin actin-binding repeat-containing protein 2 (*XIRP2*), Nexin (*SERPINE2*) ([Fig 5A](#)).

Validation of Gene Expression Pattern from Microarray Data Using qRT-PCR

Representative genes were selected for validation via qRT-PCR, using the same tissue samples used in the microarray. For these fourteen genes, the fold changes obtained via microarray analysis demonstrated substantial agreement with the fold change values determined via qRT-PCR (Pearson correlation coefficient $R > 0.7$, $p < 0.05$) thereby confirming the microarray data ([Fig 5B](#)). Two genes were no longer significantly deregulated using qPCR: *FHL1C* and *MYOT*. This could be due to different isoforms not tested by qPCR (9 targets deregulated in microarray for each of these two genes).

Altered expression of other candidate genes

We aimed to explore expression changes in candidate genes: *BNP* (Brain Natriuretic Peptide) as a heart failure marker, *SERCA2A2* (Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2, *ATP2A2*), known to be down regulated in failing hearts, and *KCNA5* coding for Kv1.5 which seems to interact with *MYO5B* and *FHL1C* (found deregulated in our microarray data) ([Fig 6](#)). We observed a statistically significant upregulation of *KCNA5* in the rTOF pigs compared to controls, and a trend to downregulation of *ATP2A2* in the rTOF pigs compared to controls. We observed a trend to upregulation of *BNP* ($p = 0.10$), however one of the 7 rTOF animals had a much stronger expression of *BNP* compared to others ([S2 Fig](#)). This rTOF pig also had one of the largest RV end-diastolic volume (data not shown).

Expression Profiling in four different regions of the myocardium

Performing the same experiments and statistical analyses on the three other localizations (right ventricle epicardium, left ventricle endocardium and left ventricle epicardium), we found a marked heterogeneity of regional gene expression. Target genes were globally differentially

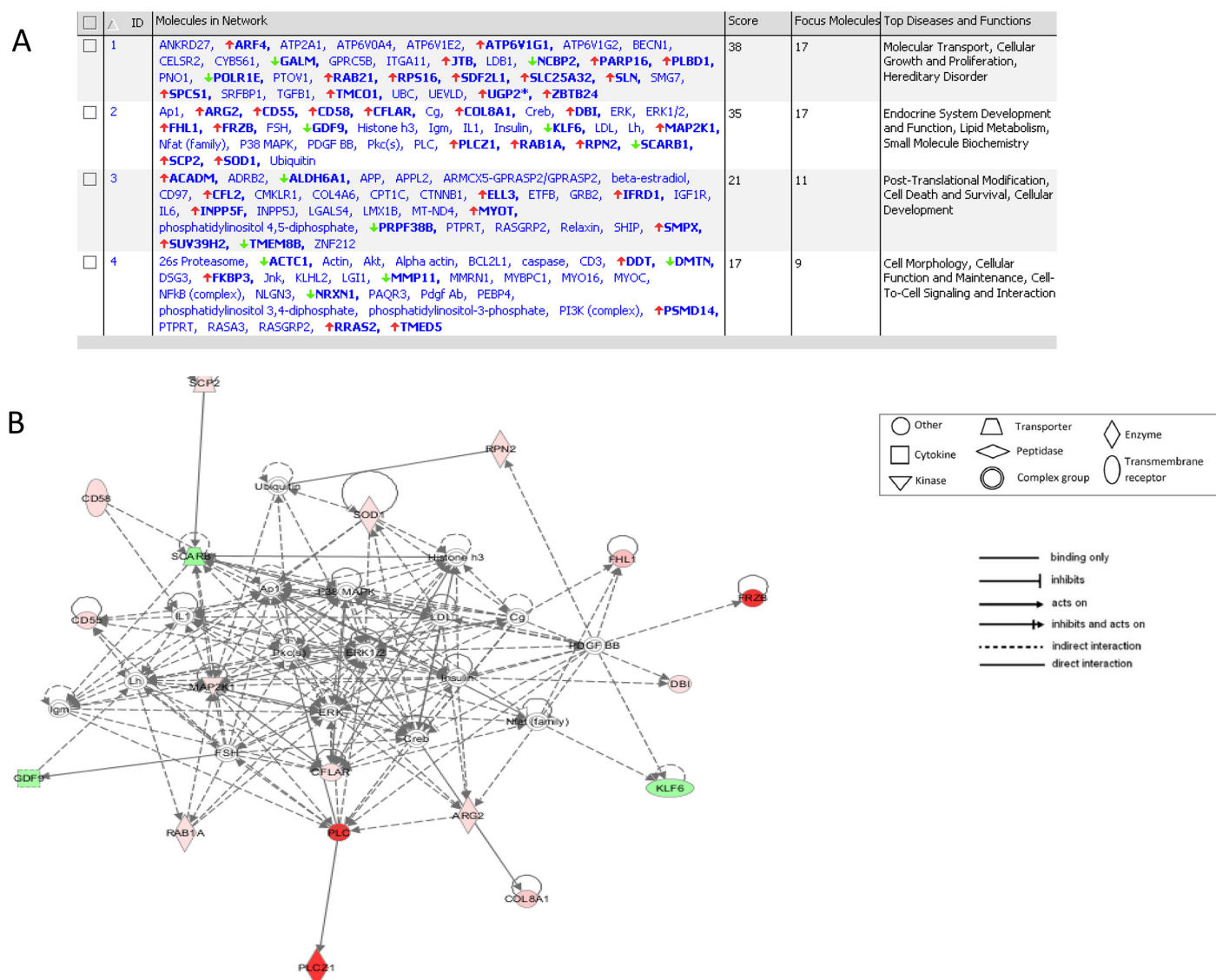


Fig 4. A. Ingenuity Pathway Analysis (IPA) generated 4 molecular networks assembled from DE genes the RV endocardium of rTOF pigs versus Controls (genes in bold) in the RV Endocardium. B. IPA Network #2. based upon differentially expressed genes that were upregulated and down regulated in the RV Endocardium.

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g004

expressed in the same way as in the RV endocardium, between the rTOF and the controls, but with no statistical significant p-value ($p > 0.05$). Table 1 shows the fold change and p-values for 14 genes of interest chosen from the RV endocardium transcriptomic data, for the three other locations.

We then used a candidate gene approach and studied, by quantitative RT-PCR, samples from the four localizations by testing 5 genes: *FRZB*, *PLCZ*, *TNNT1*, *XIRP2* and *ACTC1* (Fig 7). Surprisingly, we observed significant deregulation of these genes in the four localizations but with a lower FC. This could be due to the much higher sensitivity of qPCR compared to microarray.

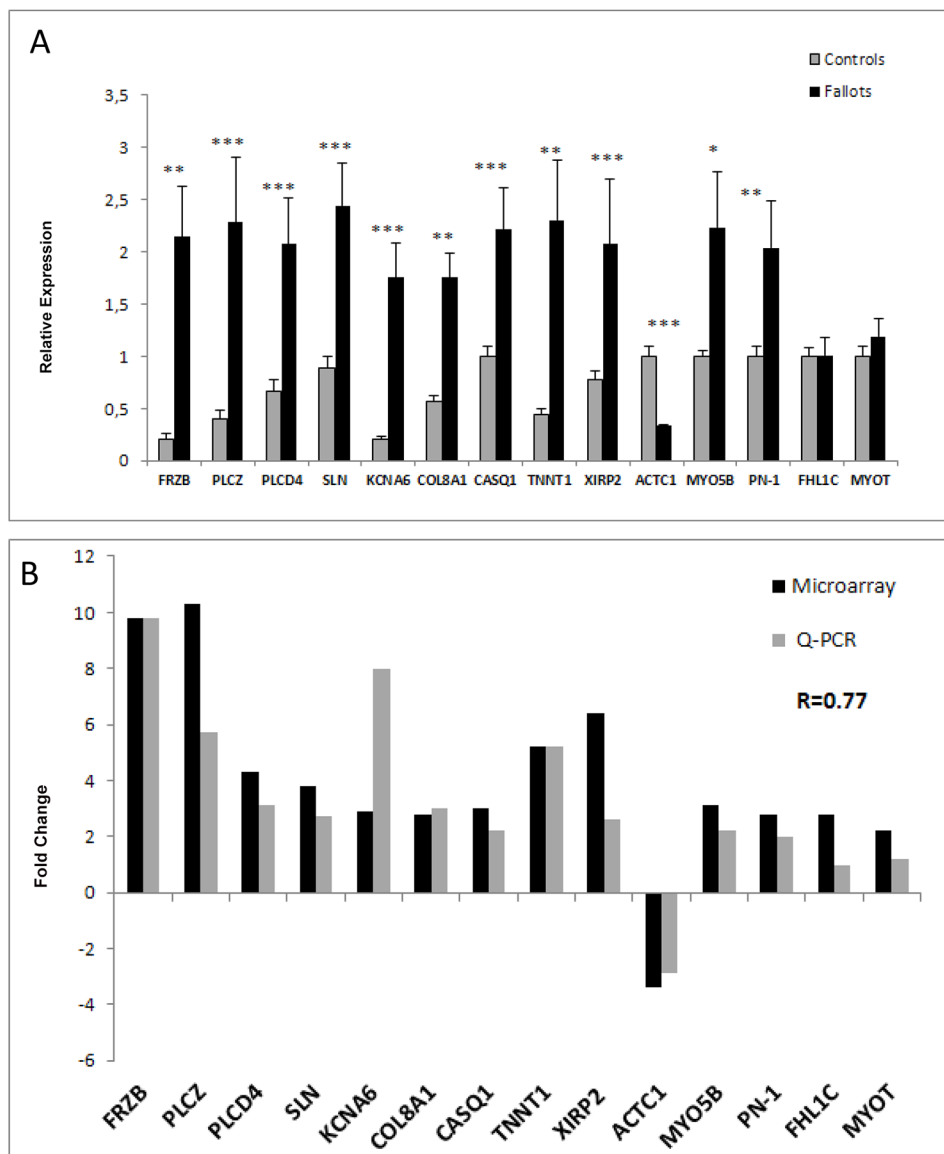


Fig 5. A. Relative expression (RT-qPCR) of genes in samples from the RV Endocardium of controls (grey bars) and rTOF (black bars) hearts. Transcript expression is normalized to the reference genes HPRT1 and GUSB. Two sided T-Test Statistical significance of $n = 5$ Controls and $n = 7$ rTOF hearts (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) B. Fold change comparison in samples from the RV Endocardium ($n = 5$ Controls and $n = 7$ rTOF hearts) based on RT-qPCR results and microarray expression data. Pearson correlation coefficient $R = 0.77$ ($p = 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g005

Discussion

To our knowledge, this study represents the first characterization of myocardial transcriptomic profiles in a long-term swine model of surgically repaired Tetralogy of Fallot. Not surprisingly, the most statistically differentially expressed genes were identified in the endocardium of the right ventricle, as expected in a model of RV primitive pathogenesis.

According to Panther Pathway software, the analysis of the 54 most DE genes in the RV endocardium revealed two main biological processes: cellular process and metabolic process. Ingenuity Pathway software pointed out the most significant canonical pathways including

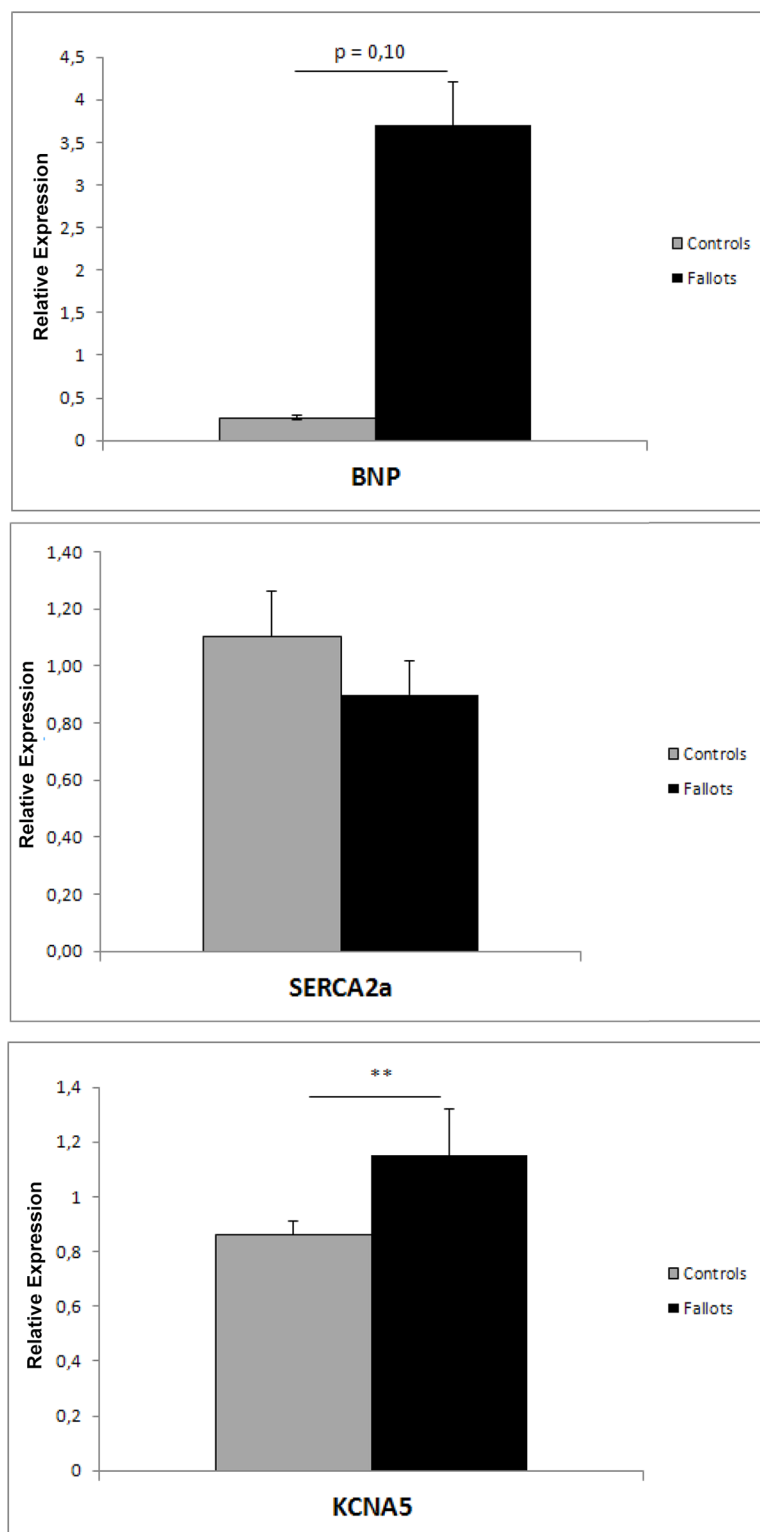


Fig 6. Relative expression (RT-qPCR) of *BNP*, *Serca2a* (*ATP2A2*) and *KCNA5* genes in samples from the RV Endocardium of controls (grey bars) and rTOF (black bars) hearts. Transcript expression is normalized to the reference genes *HPRT1* and *GUSB*. Two sided T-Test Statistical significance of $n = 5$ Controls and $n = 7$ rTOF hearts (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g006

Table 1. Fold change comparison between samples from the RV endocardium (rTOF (n = 7) versus controls (n = 5)), RV epicardium (rTOF (n = 4) versus controls (n = 4)), LV epicardium (rTOF (n = 4) versus controls (n = 4)), and LV endocardium (rTOF (n = 7) versus controls (n = 5)) based on microarray expression data of 14 genes.

Gene Symbol	Description	RV Endo	RV Epi	LV Epi	LV Endo
<i>PLCZ</i>	Phospholipase C (Zeta)	10.3 (0.025)	5.3 (0.378)	1.5 (1.000)	2.0 (0.675)
<i>FRZB</i>	Secreted frizzled-related protein	9.8 (0.042) *	17.4 (0.378)	4.4 (1.000)	2.3 (0.528)
<i>XIRP2</i>	Xin actin-binding repeat-containing protein 2	6.4 (0.003) **	2.1 (0.542)	-1.3 (1.000)	0.9 (0.915)
<i>TNNT1</i>	Troponin	5.2 (0.023) *	3.4 (0.429)	2.7 (1.000)	2.0 (0.511)
<i>PLCD4</i>	Phospholipase C D4	4.3 (0.031) *	2.2 (0.378)	1.3 (1.000)	1.5 (0.858)
<i>SLN</i>	Sarcolipin	3.8 (0.034) *	1.9 (0.588)	2.2 (1.000)	-1.2 (0.858)
<i>MYO5B</i>	Myosin	3.1 (0.004) **	2.0 (0.438)	2.9 (1.000)	2.9 (0.315)
<i>CASQ1</i>	Calsequestrin	3.0 (0.004) **	2.4 (0.378)	1.4 (1.000)	1.3 (0.793)
<i>KCNA6</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily A member 6 (Kv1.6)	2.9 (0.028) *	8.5 (0.378)	2.0 (1.000)	4.0 (0.361)
<i>COL8A1</i>	Collagen type VIII	2.8 (0.040) *	1.09 (0.79)	-1.32 (1.000)	-1.27 (0.75)
<i>FHL1C</i>	Four and a half LIM domains protein 1	2.8 (0.037) *	1.9 (0.400)	1.2 (1.000)	1.3 (0.511)
<i>PN-1</i>	Nexin	2.8 (0.006) **	1.7 (0.452)	1.3 (1.000)	1.1 (0.922)
<i>MYOT</i>	Myotilin	2.2 (0.042) *	1.6 (0.468)	1.0 (1.000)	1.3 (0.616)
<i>ACTC1</i>	Actin	-3.4 (0.040) *	-1.6 (0.536)	-1.6 (1.000)	-1.4 (0.717)

Statistical significance (*P <0.05, **P <0.01, ***P <0.001).

doi:10.1371/journal.pone.0134146.t001

oxidative stress, energy metabolism, cell communication (gap junction signaling), cell adhesion and reshaping in response to external stimuli, angiogenesis. Molecular networks were also formed with IPA software involving the lipid metabolism that may reflect the changes in energy metabolism associated with ventricular hypertrophy. In this network, ERK-PKC--MAPK are central hub molecules. The role of the pathway MAPK/ERK/PKC in cardiac hypertrophy has been well established [9,10].

Differentially expressed genes identified by microarrays were further validated using RT-qPCR. We confirmed the level of transcript abundance of fourteen genes of interest using RT-qPCR, and the Fold Changes were concordant in most cases. Among the most de-regulated genes in the endocardium of right ventricle, we identified some genes of special interest.

Heart failure markers

The BNP (Brain Natriuretic Peptide) is a cardiokine that also belongs to the fetal cardiac gene program and is used as a biomarker of cardiac hypertrophy and heart failure in humans because it is secreted in response to myocardial stretching. As expected, its expression tended to be upregulated among our rTOF pigs. The *FRZB* gene codes for a secreted frizzled-related protein B expressed in ventricular myocardium and involved in the Wnt/ β -catenin signaling cascade affecting cell proliferation signals and endocardial cushion morphogenesis [11]. This gene was found overexpressed in human failing ventricular myocardium linked to overload-associated myocyte apoptosis [12]. Its overexpression observed in our rTOF pigs is in accordance with these previous findings and confirm *FRZB* as a marker of cardiac failure due to overload. Of note, myocardial mRNA levels (and serum levels) of a cardiokine called Frizzled-related protein 3, were found elevated in patients with end-stage HF (levels correlated with HF severity and BNP dosage)[13]. These observations may also make these secreted proteins new potential therapeutic targets.

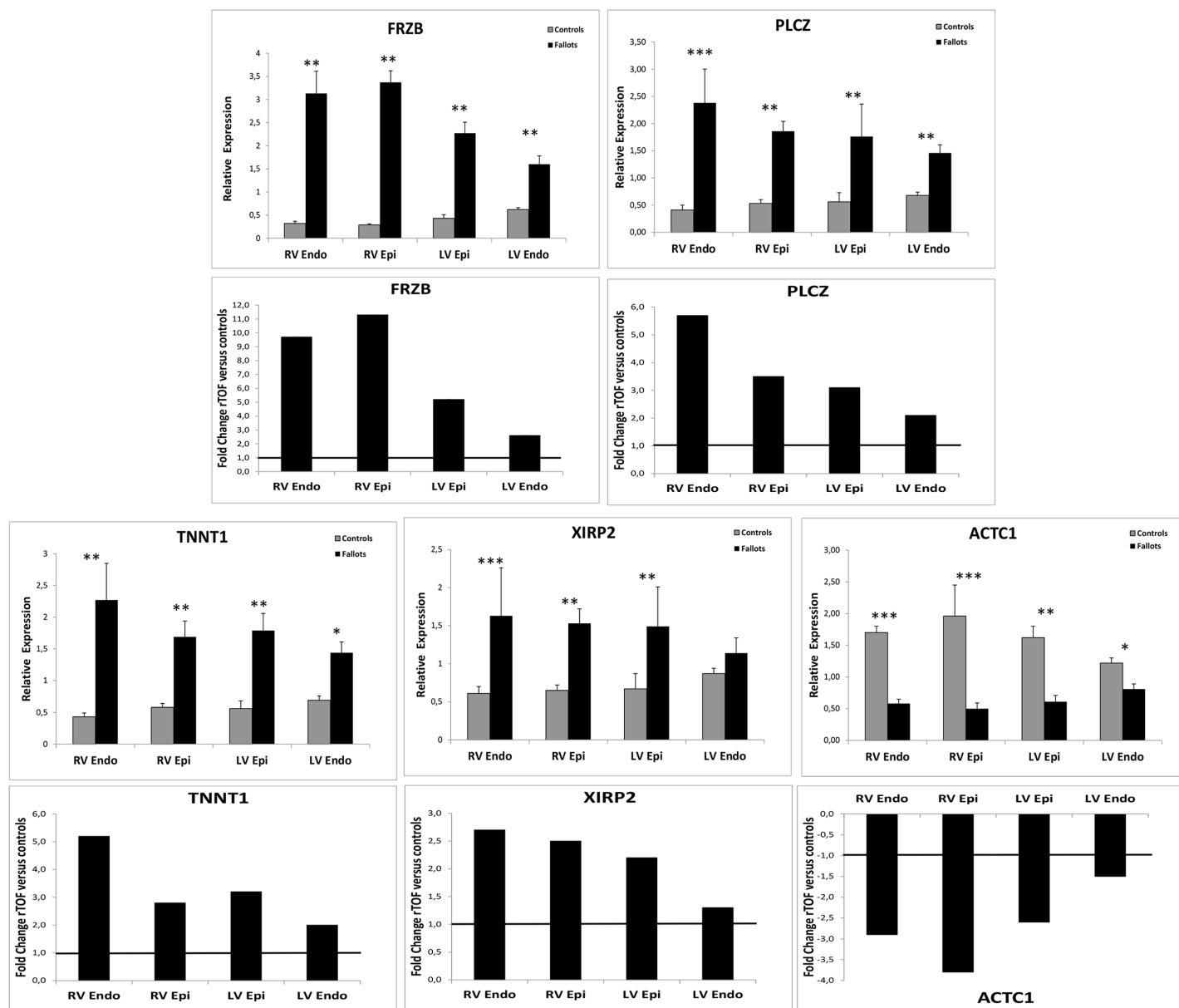


Fig 7. Relative expression (RT-qPCR) of genes in control (open bars) and Fallots (closed bars) pigs' hearts and Fold change comparison between samples of the four localizations. Transcript expression is normalized to the reference genes HPRT1 and GUSB. Two sided T-Test Statistical significance of $n = 5$ Controls and $n = 7$ rTOF hearts (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pone.0134146.g007

Calcium handling and contractile function genes

The SERCA2a protein (encoded by *ATP2A2*), is a key regulator of intracellular Ca^{2+} trafficking, pumping it back to Sarcoplasmic Reticulum during myocardial relaxation. It is also a member of the fetal cardiac gene program which is reactivated with cardiac hypertrophy. This protein tended to be down-regulated in the RV of the rTOF pigs compared to controls (even if the difference was not significant), as it was observed in human RV endomyocardial biopsies at early stage of the Fallot disease (in immature cardiomyocytes with hypertrophy and hypoxia from children aged 15 to 29 months) [14]. This downregulation of *ATP2A2* is typical of heart

failure, and was also recently described in a rat model of right heart failure [15]. Studies from Sharma or Ronkainen also pointed out a downregulation of *ATP2A2* in the cardiomyocytes of hypoxia-induced hypertrophic RV [16,17].

SLN coding for sarcolipin also belongs to the Ca^{2+} regulatory protein family. It is predominantly expressed in the cardiac atria in humans, however there are chamber specific and species specific differences in its expression [18]. *SLN* and *PLN* (phospholamban) are two small structurally similar proteins that inhibit *SERCA2a* and regulate cardiac contractility [19]. The increased expression of *SLN* in our model represents a new finding compared to the study by Wu et al. that did not find any deregulation of this gene at the RNA and protein level in human cardiomyocytes, and compared to other studies studying *SLN* under several pathological conditions [14,19]. Interestingly, Sarcolipin was found up-regulated 50 fold in the hypertrophied ventricles of *Nkx2.5* null mice [20]. Mouse models overexpressing *SLN* had reduced *SERCA2a* activity and *in vivo* measurements of cardiac function showed a significant decrease of $+dP/dt$ and $-dP/dt$ with ventricular hypertrophy. The inhibitory effect of *SLN* on these models was reversed by a β adrenergic agonist, isoproterenol, which restored cardiac contractility [21].

The absence of concomitant deregulation of *PLN* (data not shown) could argue for a possible independent role of *SLN* in inhibiting *SERCA2a*, as previously hypothesized [19].

ACTC1, coding for a cytoskeletal protein or alpha cardiac actin, was the most significantly downregulated gene in our set and was already described as associated with the pathogenesis of dilated cardiomyopathy and heart failure in several expression studies [22]. Autosomal dominant mutations in *ACTC1* were found in familial Atrial septal Defect and reduced expression of *ACTC1* was observed in different congenital heart diseases in humans including Tetralogy of Fallot [23]. Our data could suggest that this gene was more linked to the adaptative ventricular remodeling than to the genetically determined congenital cardiac malformation.

CASQ1 was found significantly up regulated in the rTOFs, however this isoform is predominantly expressed in the skeletal muscle in humans and pigs (*CASQ2* being the main cardiac isoform).

Phospholipases C D4 and Z were found upregulated in the rTOF pigs confirming the link of phospholipase C with PKC / Frizzled / Wnt signaling pathway [24].

Electrophysiology and arrhythmia-related genes

Myosin 5B coding for the unconventional myosin motor VB (among 3 members A, B, C of the class V of the myosin superfamily) is overexpressed in our model. It is a molecular motor that was recently found to regulate the cell surface trafficking of ion channels, such as *Kv1.5* (*KCNA5* gene) and control channel recycling in rat cardiomyocytes [25]. The *KCNA5* gene was also significantly upregulated in the right ventricles of our rTOF pigs. This gene, mainly expressed in the atrium, mediates *IK_{ur}* and contributes to atrial repolarization. It has also been shown to be expressed in the human left ventricle [26] and would be functional in canine ventricular myocytes [27]. It was observed in mice ventricular myocytes, contributing to repolarization [28]. However, its contribution to repolarization in human or pig ventricles remains to be demonstrated.

FHL1C was a good candidate gene as this protein, predominantly expressed in skeletal and cardiac muscle, is implicated in several hereditary myopathies and was also shown to interact *in vitro* with the voltage-gated Potassium channel *Kv1.5* [29]. However its overexpression found in microarrays was not confirmed with qPCR. Maybe this could be due to the existence of different isoforms of the gene. Further experiments are needed in order to explore this hypothesis.

Cytoskeleton/Cellular organization-related genes

KCNA6 (encoding Kv1.6 channel) is significantly expressed in human cardiac fibroblasts [30] while its expression has never been described in human or pig ventricular myocytes. Moreover, in the mouse, undifferentiated cardiac c-kit (+) cells, Kv1.6 was shown to participate in regulating cell proliferation [31]. Thus, the increase in *KCNA6* expression we observed in our animal model may reflect fibroblast proliferation.

XIRP2 (overexpressed in rTOF pigs) belongs to the evolutionarily conserved, muscle specific, actin-binding Xin gene family. This protein (mXin β) has a role in the intercalated disc maturation and post-natal heart growth in mice [32]. This gene was up regulated in several *in vitro* and *in vivo* models of hypertrophy and heart failure at early stage [33]. *XIRP2* appeared to be an essential mediator of angiotensin II-induced pathological cardiac remodeling, a direct transcriptional target of Angiotensin II signaling pathway in cardiac muscle, through MEF2A (myocyte enhancer factor), involved in cell survival pathway in cardiac stress signaling [34,35].

Interestingly, *COL8A1* was found significantly activated in our rTOF group as it was already observed in the cardiac RV of a mouse model of pulmonary artery clipping [36]. This collagen, upregulated in rTOF pigs, seems to be associated with arterial stiffness [37] but could also be a marker of RV remodeling.

Regional variations in gene expression

Transcriptional responses in the left ventricle in our set of experiments followed the same tendency than for the right ventricle, but were much less strong. Comparison of the expression levels of different genes (*TNNT1*, *FRZB*, *ACTC1*, *PLCZ* and *XIRP2*), in all four locations, led to hypothesize the existence of a molecular “gradient” of expression progressing from the RV to the LV of rTOF pigs. Mechanical stress could be transmitted from RV to LV through molecular and cellular alterations mediated by transcriptomic changes of certain genes. The nature and extent of gene expression vary with time. Indeed, distinct transcriptional changes were observed at different time-points after pulmonary artery clipping surgery in a mouse model [36]. Therefore it will be of interest to perform transcriptomic studies at different stages post-surgery and study the progression of the molecular remodeling in our animal model.

Limitations

mRNA deregulations may not always reflect abnormal protein levels, since translational processes and post-translational modifications may occur. We performed some protein studies by western blot in order to confirm the mRNA changes at the protein level: for example *TNNT1* protein tend to be upregulated in the rTOF pigs, as observed in mRNA studies (S3 Fig). Studies on phosphorylation of different proteins will also be of interest in order to decipher post-translational changes already observed in cardiac failure.

Moreover, the incomplete annotation of the *sus scrofa* microarray constitutes a limitation of this study as important genes, not present or not annotated in the chip, could be missed and signaling pathways of interest could be incompletely deciphered. This led us to have a complementary target gene approach by performing RT-qPCR directly on other genes of interest.

Conclusion

Cardiac studies performed on pigs proved to be of interest as large animal models have a closer physiology to humans than small mammal models. Moreover, use of cDNA microarrays is a good and cost-effective tool to identify new candidate genes by systematic exploration of gene expression on a genome-wide scale. By providing wide information it should permit potential

comparisons among different models and contribute to a greater understanding of the molecular mechanisms linked to cardiac disease.

Supporting Information

S1 Fig. Final day cardiac function evaluation in Control and Fallot pigs. Anesthetised pigs underwent cardiac magnetic resonance examination at 23 ± 1 weeks. A: Cardiac equatorial short axis view of a Fallot pig showing RV hypertrophy, dilation and septal bulging. B: RV end-diastolic volume (RVEDV) was significantly increased in Fallot pigs compared to Control indicating RV dilatation. C: RV ejection fraction (RVEF) was significantly lower in Fallot pigs than Controls highlighting RV dysfunction. Control N = 4, Fallot N = 6, * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$. (TIF)

S2 Fig. BNP gene expression in Rv endocardium. Relative expression (RT-qPCR) of BNP gene in samples from the RV endocardium of controls and rTOF hearts. Transcript expression is normalized to the reference genes HPRT1 and GUSB. (TIF)

S3 Fig. TNNT1 Western blot. 50 μ g of total protein were loaded for TNNT1 Western blot analysis. Quantification of band intensity was calculated after normalization for total protein loaded ($p = 0.08$). (TIF)

S1 Table. List of 54 HUGO genes differentially expressed in rTOF pigs (microarrays data). (TIF)

S2 Table. List of genes involved in each of the 22 most significant canonical pathways (IPA). (TIF)

Acknowledgments

We thank the staff of molecular genetics laboratory of CHU Bordeaux for their technical help and for microarrays scanning facilities.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CR SC FR DB OB JBT PB. Performed the experiments: SC FR DB VD MC DV SG DE BQ. Analyzed the data: CR SC DB. Wrote the paper: CR SC. Head of the research department: MH.

References

1. Apitz C, Webb GD, Redington AN. Tetralogy of Fallot. *Lancet*. 2009; 374: 1462–1471. doi: [10.1016/S0140-6736\(09\)60657-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60657-7) PMID: [19683809](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19683809/)
2. Uebing A, Gibson DG, Babu-Narayan SV, Diller GP, Dimopoulos K, Goktekin O, et al. Right ventricular mechanics and QRS duration in patients with repaired tetralogy of Fallot: implications of infundibular disease. *Circulation*. 2007; 116: 1532–1539. PMID: [17875972](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17875972/)
3. Bordachar P, Iriart X, Chabaneix J, Sacher F, Lafitte S, Jais P, et al. Presence of ventricular dyssynchrony and haemodynamic impact of right ventricular pacing in adults with repaired Tetralogy of Fallot and right bundle branch block. *Europace*. 2008; 10: 967–971. doi: [10.1093/europace/eun178](https://doi.org/10.1093/europace/eun178) PMID: [18603611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18603611/)
4. Abd El Rahman MY, Hui W, Yigitbasi M, Dsebissowa F, Schubert S, Hetzer R, et al. Detection of left ventricular asynchrony in patients with right bundle branch block after repair of tetralogy of Fallot using tissue-Doppler imaging-derived strain. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 45: 915–921. PMID: [15766829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15766829/)

5. Leite-Moreira AF, Lourenco AP, Balligand JL, Bauersachs J, Clerk A, De Windt LJ, et al. ESC Working Group on Myocardial Function Position Paper: how to study the right ventricle in experimental models. *Eur J Heart Fail.* 2014; 16: 509–518. doi: [10.1002/ehf.66](https://doi.org/10.1002/ehf.66) PMID: [24574252](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24574252/)
6. Thambo JB, Roubertie F, De Guillebon M, Labrousse L, Iriart X, Ntsinjana H, et al. Validation of an animal model of right ventricular dysfunction and right bundle branch block to create close physiology to postoperative tetralogy of Fallot. *Int J Cardiol.* 2012; 154: 38–42. doi: [10.1016/j.ijcard.2010.08.063](https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2010.08.063) PMID: [20851478](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20851478/)
7. Gray KA, Yates B, Seal RL, Wright MW, Bruford EA. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D1079–1085. doi: [10.1093/nar/gku1071](https://doi.org/10.1093/nar/gku1071) PMID: [25361968](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25361968/)
8. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc.* 2009; 4: 44–57. doi: [10.1038/nprot.2008.211](https://doi.org/10.1038/nprot.2008.211) PMID: [19131956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19131956/)
9. Zhang W, Elimban V, Nijjar MS, Gupta SK, Dhalla NS. Role of mitogen-activated protein kinase in cardiac hypertrophy and heart failure. *Exp Clin Cardiol.* 2003; 8: 173–183. PMID: [19649217](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19649217/)
10. Bueno OF, Molkentin JD. Involvement of extracellular signal-regulated kinases 1/2 in cardiac hypertrophy and cell death. *Circ Res.* 2002; 91: 776–781. PMID: [12411391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12411391/)
11. Gitler AD, Lu MM, Jiang YQ, Epstein JA, Gruber PJ. Molecular markers of cardiac endocardial cushion development. *Dev Dyn.* 2003; 228: 643–650. PMID: [14648841](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14648841/)
12. Schumann H, Holtz J, Zerkowski HR, Hatzfeld M. Expression of secreted frizzled related proteins 3 and 4 in human ventricular myocardium correlates with apoptosis related gene expression. *Cardiovasc Res.* 2000; 45: 720–728. PMID: [10728394](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10728394/)
13. Askevold ET, Aukrust P, Nymo SH, Lunde IG, Kaasboll OJ, Aakhus S, et al. The cardiokine secreted Frizzled-related protein 3, a modulator of Wnt signalling, in clinical and experimental heart failure. *J Intern Med.* 2014; 275: 621–630. doi: [10.1111/joim.12175](https://doi.org/10.1111/joim.12175) PMID: [24330105](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24330105/)
14. Wu Y, Feng W, Zhang H, Li S, Wang D, Pan X, et al. Ca(2+)-regulatory proteins in cardiomyocytes from the right ventricle in children with congenital heart disease. *J Transl Med.* 2012; 10: 67. doi: [10.1186/1479-5876-10-67](https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-67) PMID: [22472319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22472319/)
15. Benoist D, Stones R, Benson AP, Fowler ED, Drinkhill MJ, Hardy ME, et al. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Prog Biophys Mol Biol.* 2014; 115: 162–172. doi: [10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.008](https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2014.06.008) PMID: [25016242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25016242/)
16. Sharma S, Taegtmeyer H, Adrogué J, Razeghi P, Sen S, Ngumbela K, et al. Dynamic changes of gene expression in hypoxia-induced right ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 286: H1185–1192. PMID: [14630626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14630626/)
17. Ronkainen VP, Skoumal R, Tavi P. Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements. *J Mol Cell Cardiol.* 2011; 50: 1008–1016. doi: [10.1016/j.yjmcc.2011.02.017](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.017) PMID: [21382378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21382378/)
18. Vangheluwe P, Schuermans M, Zador E, Waelkens E, Raeymaekers L, Wuytack F. Sarcolipin and phospholamban mRNA and protein expression in cardiac and skeletal muscle of different species. *Biochem J.* 2005; 389: 151–159. PMID: [15801907](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15801907/)
19. Bhupathy P, Babu GJ, Periasamy M. Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase. *J Mol Cell Cardiol.* 2007; 42: 903–911. PMID: [17442337](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17442337/)
20. Pashmforoush M, Lu JT, Chen H, Amand TS, Kondo R, Pradervand S, et al. Nkx2-5 pathways and congenital heart disease; loss of ventricular myocyte lineage specification leads to progressive cardiomyopathy and complete heart block. *Cell.* 2004; 117: 373–386. PMID: [15109497](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15109497/)
21. Asahi M, Otsu K, Nakayama H, Hikoso S, Takeda T, Gramolini AO, et al. Cardiac-specific overexpression of sarcolipin inhibits sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA2a) activity and impairs cardiac function in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101: 9199–9204. PMID: [15201433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15201433/)
22. Asakura M, Kitakaze M. Global gene expression profiling in the failing myocardium. *Circ J.* 2009; 73: 1568–1576. PMID: [19638707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19638707/)
23. Jiang HK, Qiu GR, Li-Ling J, Xin N, Sun KL. Reduced ACTC1 expression might play a role in the onset of congenital heart disease by inducing cardiomyocyte apoptosis. *Circ J.* 2010; 74: 2410–2418. PMID: [20962418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962418/)
24. Dawson K, Aflaki M, Nattel S. Role of the Wnt-Frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential. *J Physiol.* 2013; 591: 1409–1432. doi: [10.1113/jphysiol.2012.235382](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.235382) PMID: [23207593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23207593/)
25. Schumacher-Bass SM, Vesely ED, Zhang L, Ryland KE, McEwen DP, Chan PJ, et al. Role for myosin-V motor proteins in the selective delivery of Kv channel isoforms to the membrane surface of cardiac myocytes. *Circ Res.* 2014; 114: 982–992. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.114.302711](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.302711) PMID: [24508725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24508725/)

26. Ordog B, Brutyo E, Puskas LG, Papp JG, Varro A, Szabad J, et al. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int J Cardiol.* 2006; 111: 386–393. PMID: [16257073](#)
27. Sridhar A, da Cunha DN, Lacombe VA, Zhou Q, Fox JJ, Hamlin RL, et al. The plateau outward current in canine ventricle, sensitive to 4-aminopyridine, is a constitutive contributor to ventricular repolarization. *Br J Pharmacol.* 2007; 152: 870–879. PMID: [17700726](#)
28. Odagiri F, Inoue H, Sugihara M, Suzuki T, Murayama T, Shioya T, et al. Effects of candesartan on electrical remodeling in the hearts of inherited dilated cardiomyopathy model mice. *PLoS One.* 2014; 9: e101838. doi: [10.1371/journal.pone.0101838](#) PMID: [25000405](#)
29. Poparic I, Schreibmayer W, Schoser B, Desoye G, Gorischek A, Miedl H, et al. Four and a half LIM protein 1C (FHL1C): a binding partner for voltage-gated potassium channel K(v1.5). *PLoS One.* 2011; 6: e26524. doi: [10.1371/journal.pone.0026524](#) PMID: [22053194](#)
30. Li GR, Sun HY, Chen JB, Zhou Y, Tse HF, Lau CP. Characterization of multiple ion channels in cultured human cardiac fibroblasts. *PLoS One.* 2009; 4: e7307. doi: [10.1371/journal.pone.0007307](#) PMID: [19806193](#)
31. Han Y, Chen JD, Liu ZM, Zhou Y, Xia JH, Du XL, et al. Functional ion channels in mouse cardiac c-kit (+) cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010; 298: C1109–1117. doi: [10.1152/ajpcell.00207.2009](#) PMID: [20130208](#)
32. Wang Q, Lin JL, Reinking BE, Feng HZ, Chan FC, Lin CI, et al. Essential roles of an intercalated disc protein, mXinbeta, in postnatal heart growth and survival. *Circ Res.* 2010; 106: 1468–1478. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.109.212787](#) PMID: [20360251](#)
33. Wang Q, Lin JL, Erives AJ, Lin CI, Lin JJ. New insights into the roles of Xin repeat-containing proteins in cardiac development, function, and disease. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014; 310: 89–128. doi: [10.1016/B978-0-12-800180-6.00003-7](#) PMID: [24725425](#)
34. Lu B, Yu H, Zwartbol M, Ruirok WP, van Gilst WH, de Boer RA, et al. Identification of hypertrophy- and heart failure-associated genes by combining in vitro and in vivo models. *Physiol Genomics.* 2012; 44: 443–454. doi: [10.1152/physiolgenomics.00148.2011](#) PMID: [22353257](#)
35. McCalmon SA, Desjardins DM, Ahmad S, Davidoff KS, Snyder CM, Sato K, et al. Modulation of angiotensin II-mediated cardiac remodeling by the MEF2A target gene Xirp2. *Circ Res.* 2010; 106: 952–960. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.109.209007](#) PMID: [20093629](#)
36. Kreymborg K, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinkel R, et al. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010; 49: 598–605. doi: [10.1016/j.yjmcc.2010.07.014](#) PMID: [20673770](#)
37. Levy D, Larson MG, Benjamin EJ, Newton-Cheh C, Wang TJ, Hwang SJ, et al. Framingham Heart Study 100K Project: genome-wide associations for blood pressure and arterial stiffness. *BMC Med Genet.* 2007; 8 Suppl 1: S3. PMID: [17903302](#)