

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ**

**EA 3072 Mitochondrie, Stress oxydant et protection musculaire  
Département de Physiologie, Faculté de médecine de Strasbourg, en  
collaboration avec le centre de référence des Malformations Cardiaques  
Congénitales Complexes –M3C, Necker Enfants Malades.**

**THÈSE** présentée par :

**Sébastien GERELLI**

soutenue le : **22 septembre 2016**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Sciences du vivant / Physiologie et Biologie des  
Organismes, Populations interactions

**OPTIMISATION DE LA PRISE EN CHARGE  
DES CŒURS UNIVENTRICULAIRES :  
APPROCHE CHIRURGICALE ET  
ENERGETIQUE**

**THÈSE dirigée par :**

**M. GENY Bernard**  
**M. BOUDJEMLINE Younes**

Professeur, université de Strasbourg  
Professeur, hôpital Necker, APHP, Paris

**RAPPORTEURS :**

**M. KREITMANN Bernard**  
**M. NINET Jean**

Professeur, CHU de Bordeaux  
Professeur, hôpital Louis Pradel, Bron

**AUTRE MEMBRE DU JURY :**

**M. OHLMANN Patrick**

Professeur, CHU de Strasbourg

---

**INVITÉS :**

**M. MAZZUCOTELLI Jean-Philippe**  
**M. RAISKY Olivier**

Professeur, CHU de Strasbourg  
Professeur, hôpital Necker, APHP, Paris

## Dédicace

Je dédicace cette thèse aux enfants et familles qui souffrent de cette cardiopathie, et qui nous donnent la force, l'énergie de poursuivre nos travaux ainsi qu'à tous ceux qui m'ont aidé, directement ou indirectement.

Grâce à vous, peut-être que ce travail permettra d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des enfants porteurs d'un ventricule unique.

Nous continuons nos recherches avec enthousiasme et passion, convaincus que nous saurons un jour restaurer la fonction myocardique de nos patients face aux grandes pathologies cardiaques.

# Remerciements

## **A Monsieur le Professeur Bernard Geny, *Directeur de thèse,***

Cher Maître, cher Bernard, il n'y a pas de mots assez forts pour te remercier, tu as toujours été présent à mes côtés dans les moments les plus difficiles, tu m'as beaucoup appris. Nous devrions encore vivre de belles aventures ! Reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

## **A Monsieur le Professeur Younes Boudjemline, *Co-Directeur de thèse,***

Cher Maître, cher Younes, merci pour ces années passées à tes cotés au laboratoire. Ton enseignement m'a été précieux et ton enthousiasme un modèle. Reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

## **A Monsieur le Professeur Bernard Kreitmann, *Rapporteur externe***

Cher Maître, cher Bernard, merci d'accepter d'être l'examineur externe de ce travail. Je te remercie également pour ton soutien les années passées, tes conseils avisés et ta présence dans mon jury. Tu fais un travail remarquable au sein de la société pour notre spécialité. Reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

## **A Monsieur le Professeur Jean Ninet, *Rapporteur externe***

Cher Maître, merci d'être l'examineur externe de ma thèse. C'est avec spontanéité que vous m'avez fait l'honneur d'examiner ce travail. Vous avez beaucoup œuvré dans la formation des jeunes chirurgiens cardiaque, et toujours fait l'unanimité dans vos méthodes pédagogiques. Votre présence parmi les membres de ce jury est un privilège. Soyez assuré de mon plus profond respect.

## **A Monsieur le Professeur Patrick Ohlmann, *Rapporteur interne***

Cher Maître, cher Patrick, merci d'être l'examineur interne de ma thèse. Cela aura été un plaisir de travailler à tes côtés au NHC et un regret d'avoir dû quitter ton équipe. Ta rigueur, ton goût pour l'innovation et ta gentillesse sont exemplaires. Merci encore pour l'honneur que

tu me fais de par ta présence parmi les membres de ce jury. Reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**A Monsieur le Professeur Olivier Raisky,**

Cher Maître, cher Olivier, cher ami, que de temps et d'aventures passées ensemble. Je te dois énormément tant sur le plan professionnel que personnel. Tu es un médecin exemplaire, plus que tes qualités techniques encore, l'humanité et la passion qui t'animent dans ton travail sont sans égal. Merci d'accepter de participer à mon jury de thèse. Reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**A Monsieur le Professeur Jean Philippe Mazzucotelli,**

Cher Maître, cher Jean-Philippe, je te suis extrêmement reconnaissant pour tout ce que tu as fait pour moi, et aucun adjectif n'est assez fort pour te le témoigner. Jamais je n'aurai imaginé devoir quitter ton équipe, je l'ai vécu comme une tragédie. Merci d'accepter de participer à mon jury de thèse. Je t'exprime mon plus profond respect et mon amitié la plus sincère.

**A Monsieur le Professeur Bernard Eisenmann,**

Cher Maître, cher Bernard, sans vous rien de ce travail n'aurait été possible. Je vous dois beaucoup. Vous m'avez accueilli, formé, soutenu et toujours encouragé pour faire de moi un chirurgien cardiaque passionné par son travail. Votre rigueur, ténacité, force de travail sont des exemples qui m'aident au quotidien. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis et enseigné. Veuillez recevoir mon plus profond respect et toute mon amitié.

**A Monsieur le professeur Pascal Vouhé,**

Cher Maître, merci de m'avoir soutenu et permis de réaliser ces travaux au sein de votre service. Ces trois années passées à vos côtés ont été riches d'enseignements. Vous aurez réussi à finaliser ma formation, mais surtout vous m'aurez armé pour affronter les difficultés que nous pouvons rencontrer dans notre métier. Votre dévouement pour notre spécialité et votre capacité de travail resteront des modèles. Je vous adresse mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**A toute l'équipe d'accueil 3072 et tout particulièrement aux Docteurs Jofrey Zoll , Anne Laure Langue et Jamal Bouitbir.**



Votre enseignement et votre soutien tout au long de ce parcours ont entretenu ma curiosité et mon enthousiasme. Parti sur le remodelage ventriculaire, vous m'avez fait découvrir et transmis votre passion pour la mitochondrie ; depuis, que de lectures, d'expérimentations et toujours ce symbiote, cœur énergétique de nos cellules, me rappelant mes débuts à vos côtés. Je vous adresse ma plus grande reconnaissance, dans l'attente de poursuivre nos travaux ensemble.

**A toute l'équipe d'XP Med et tout particulièrement à Michel Bonneau, Chantal Kang et Julien Kanhonou.**

Chers amis, merci pour tout, vous avez su créer le plus beau des modèles au sein de votre laboratoire, une chaîne humaine passionnée par la recherche qui ne renonce devant aucun défi. Nous allons continuer nos travaux ensemble au sein d'AERI, à ma plus grande joie, pour terminer nos projets et découvrir de nouveaux horizons. Recevez mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**Aux Docteurs Michel Kindo, Danis Hoang et Olivier Metton,**

Chers amis, je vous remercie chaleureusement pour vos conseils, collaboration et contribution dans ce travail. Nous partageons une passion commune au quotidien, le cœur de nos patients et la conviction que nous pouvons encore mieux faire pour eux. Voilà pourquoi nos chemins se sont croisés dans des laboratoires, et pourquoi nous sommes restés si proche. J'espère que nous aurons encore l'opportunité de travailler ensemble. Veuillez recevoir mes plus sincères amitiés.

**A mon ami le Docteur Mathieu van Steenberghe,**

Cher Mathieu, cher ami, nous nous croisons en 2010 à Necker et depuis nous avançons ensemble ; merci pour ton aide, ton soutien, tes conseils et ta contribution dans ce travail. Nous partageons une vision commune sur bien tant de choses, il s'agit d'une force que nous allons continuer à exploiter côte à côte quels que soient les tumultes pour aller au bout et je m'en réjouis. Courage à toi et reçois mes plus sincères amitiés.

**A mon frère le Docteur Emmanuel Gerelli,**

Cher Manu, la vie est incroyable. Comment est-il possible que nous nous retrouvions 20 ans plus tard sur le complexe IV de la mitochondrie. Toi physicien, moi chirurgien, tous deux passionnés par la recherche.

Es-tu Mécaniste ou Finaliste ?

Merci pour ton aide, ton soutien et tes explications dans ce travail. Je suis heureux et je me réjouis de travailler avec toi. De grand travaux nous attendent. Je t'embrasse bien fort.

**Au Docteur Thomas Leti,**

Cher Thomas, merci pour ton aide, ta collaboration et tes conseils sur cette thèse. Tu as su t'adapter et faire preuve d'intérêt pour ce travail. J'espère que nous allons travailler encore longtemps ensemble et que tu trouveras un épanouissement professionnel au sein d'AERI. Reçois toute mon amitié.

**Au Docteur Nicolas Chavanis,**

Cher Nicolas, merci de m'avoir ouvert les portes du service de chirurgie cardiaque que tu as bâti, chaque matin je suis heureux de venir travailler à tes côtés et jamais je n'ai regretté mon choix. Sans ton humeur égale, ta gentillesse et ton soutien au quotidien, je n'aurais jamais réussi à terminer ce travail. Nous devrions ensemble faire encore de belles et grandes choses pour nos patients. Reçois mon amitié la plus sincère.

**Aux Docteurs Georges Wagnieres et Hubert Vandenberg**

Chers Docteurs Wagnieres et Vandenberg, merci pour votre écoute et nos échanges ouvrant de belles perspectives et de grands espoirs dans le traitement des pathologies cardio-vasculaires. J'ai hâte de démarrer notre collaboration avec votre Laboratoire. Veuillez recevoir mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**Au Docteur Anne Lejay,**

Chère Anne, merci pour ton aide et ta contribution dans ce travail. Au plaisir peut être de travailler ensemble. Reçois mes sincères amitiés.

**A Mme la cadre, Maryse Leti,**

Chère Maryse, toi qui m'a connu en culotte courte, quel hasard nous a réuni 30 ans plus tard dans le service de chirurgie cardiaque d'Annecy ? En tout cas, sache que de travailler à tes côtés est un plaisir ; ton humeur, ta gentillesse et tes compétences sont hors normes.

Je te remercie pour ton aide et ta collaboration dans ce travail, reçois mon plus profond respect et mes sincères amitiés.

**A toute l'équipe de chirurgie cardiaque d'Annecy,**

Médecins, infirmiers, aides-soignants, je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre équipe. Votre professionnalisme et passion pour votre métier sont exemplaires, chaque jour les patients me le rappellent. Sachez que sans votre support je n'aurai pas réussi à terminer ce travail. Veuillez recevoir ma plus grande admiration et mes sincères amitiés.

**A mes parents**

Merci pour toutes ces années d'effort et de soutien à mes côtés. J'ai toujours pu compter sur vous, dans toutes circonstances et sans justification. Je vous adresse ma plus grande reconnaissance et mon plus profond respect.

**A ma tendre femme Carine et à ma petite fille Eva**

Merci mes chéries pour votre soutien dans mes passions égoïstes, toujours sans reproche et d'humeur constante. Votre accompagnement fidèle est source de quiétude et d'inspiration, sans vous rien de cela ne serait possible. Je vous adresse mon amour éternel.

## Table des matières

Dédicace.....	1
Remerciements.....	2
Liste des figures .....	10
Abréviations.....	11
Introduction.....	13
Première partie Préambule.....	20
1 Préambule .....	21
1.1 Le cœur univentriculaire.....	21
1.1.1 Principes généraux.....	21
1.1.2 Conditions d'une circulation univentriculaire optimale .....	22
1.2 La circulation de Fontan .....	23
1.3 La chirurgie de Fontan.....	23
1.3.1 Premier temps chirurgical dans la conception d'une circulation de Fontan ....	24
1.3.2 Second temps chirurgical.....	24
1.4 La chirurgie Hybride.....	26
1.5 Approche énergétique .....	31
1.5.1 Energétique musculaire : fonction mitochondriale et stress oxydant .....	31
1.5.2 Le stress oxydant.....	41
1.5.3 Cardiomyoplastie et pulsatilité .....	50
Deuxième partie Travaux de recherche : Problématique et Hypothèse.....	54
2 Problématique et hypothèse .....	55
2.1 Analyse rétrospective.....	55
2.2 Méthodes alternatives .....	64
2.2.1 La Totalisation de Fontan par chirurgie hybride.....	64
2.2.2 Approche énergétique et du stress oxydant dans le cœur .....	64
Troisième partie Résultats.....	66
3 Résultats.....	67
3.1 Elaboration expérimentale d'une totalisation de Fontan par une approche hybride.....	67
3.2 Conception d'un modèle animal .....	67
3.2.1 Travaux expérimentaux d'approche .....	67
3.2.2 Conception d'un modèle animal fiable et reproductible.....	70
3.3 Evaluation longitudinale expérimentale d'une totalisation de Fontan par voie percutanée .....	79

3.3.1	Introduction.....	79
3.3.2	Méthodes.....	79
3.3.3	Résultats et discussion .....	80
3.3.4	Limitations .....	81
3.3.5	Conclusion .....	81
3.4	Evaluation longitudinale expérimentale d'une totalisation de Fontan sur un modèle en croissance.....	88
3.4.1	Introduction.....	88
3.4.2	Méthodes.....	88
3.4.3	Résultats et discussion .....	89
3.4.4	Implications cliniques .....	90
3.4.5	Limitations .....	91
3.4.6	Conclusion .....	91
3.5	Evaluation de la fonction mitochondriale et du stress oxydant au niveau de l'endocarde et de l'épicarde dans un cœur sain .....	103
3.5.1	Introduction.....	103
3.5.2	Méthodes.....	104
3.5.3	Résultats et discussion .....	106
3.6	Evaluation de la fonction mitochondriale et du stress oxydant au niveau de l'endocarde et de l'épicarde, dans un cœur sain et en surcharge .....	118
3.6.1	Introduction.....	118
3.6.2	Méthodes.....	119
3.6.3	Résultats et discussion .....	121
3.6.4	Limitations de l'étude .....	122
3.6.5	Conclusion .....	123
3.7	Evaluation de la Fonction mitochondriale dans un cœur en décharge ventriculaire 138	
3.7.1	Design expérimental – introduction.....	138
3.7.2	Matériel et méthode .....	138
3.7.3	Résultats et Discussion .....	139
3.8	Les prémices de la conception d'un tube pulsatile .....	140
3.8.1	Conception d'un tube pulsatile : Modèle In vivo.....	141
3.8.2	Conception d'un tube pulsatile Modèle Ex vivo.....	143
	Quatrième partie.....	146

4	Discussion et Perspectives .....	147
4.1	La chirurgie hybride.....	147
4.2	Optimisation du métabolisme énergétique myocardique.....	152
4.2.1	Différences transmuraux des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans un cœur sain.....	153
4.2.2	Surcharge en pression – adaptation énergétique et production de ROS .....	155
4.2.3	Influence du gradient transmural myocardique mécanique dans la régulation du métabolisme énergétique. ....	157
4.3	Optimisation de la prise en charge d’un cœur uni ventriculaire .....	161
4.4	Perspectives.....	163
4.4.1	Elaboration d’un projet de recherche clinique pour la totalisation de Fontan par voie percutanée .....	163
4.4.2	Evaluation et Rôle du NO, NOS, PTPm sur un myocarde en dette énergétique 163	
4.4.3	Approche énergétique myocardique : PBM.....	164
4.4.4	Approche énergétique extra-myocardique : La conception d’un tube pulsatile 165	
	Conclusion .....	166
	Bibliographie.....	168
	Résumé.....	178
	Résumé en anglais .....	178

## Liste des figures

Figure 1 – Procédure interventionnelle de Klima et al. ....	28
Figure 2 – Procédure interventionnelle de Galantowicz et al. ....	29
Figure 3 – Procédure interventionnelle de Konstantinov et al. ....	30
Figure 4 - Procédure interventionnelle de Konstantinov et al. ....	30
Figure 5 – Structure d’une mitochondrie .....	32
Figure 6 – Le cycle de Krebs .....	34
Figure 7 – Chaîne de transport des électrons .....	35
Figure 8 – Structure de l’ATP synthase .....	38
Figure 9 – Radicaux libres et antioxydants enzymatiques .....	44
Figure 10 – Production de ROS, ouverture du PTPm et apoptose .....	48
Figure 11 – Voies de l’apoptose .....	49
Figure 12 – Anneaux et stents couverts .....	68
Figure 13 – Vues schématiques de chaque étape de la procédure .....	68
Figure 14 – Différentes étapes de l’intervention .....	69
Figure 15 - Photographie d’un cœur greffé en position hétérotopique (photographie de gauche) et technique schématique selon Hasegawa et al (schéma de droite) .....	138
Figure 16 - Données de la respiration mitochondriale par unité de poids, des différents complexes de la chaîne respiratoire sur un cœur de rat en décharge ventriculaire. Les histogrammes hachurés représentent les mitochondries des cardiomyocytes endocardiques et les histogrammes noirs celles des cardiomyocytes épicaudiques .....	140
Figure 17 - Prélèvement du muscle grand dorsal droit en lambeau pédiculé .....	142
Figure 18 -Evaluation in-vivo la fraction de raccourcissements du tube monté sur un stent à mémoire de forme .....	142
Figure 19 - Anastomose cavo-cave avec interposition du tube Contegra® de 22 mm, incorporé dans un stent à mémoire de forme, sur lequel est disposé circulairement le muscle grand dorsal .....	143
Figure 20 - C-Pulse Heart Assist : dispositif d’assistance pneumatique aortique. ....	145

## Abréviations

AD = atrium droit

AIF = Apoptosis-Inducing Factor

ANT = l'Adenine Nucleotide Translocator

AP = artère pulmonaire

BAK1 = Bcl-2 antagonist killer

BAX = Bcl-2 associated X protein

CEC = circulation extra-corporelle

CRM = chaîne respiratoire mitochondriale

DCPP = dérivation cavo-pulmonaire partielle

DCPT = dérivation cavo-pulmonaire totale

Endo = couche musculaire sous-endocardique

Epi = couche musculaire sous-épicardique

FADD = Fas Associated Death Domain

GPX = glutathion peroxydase

GR = glutathion réductase

GSH = glutathion réduit

GSSG = glutathion-disulfure

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = peroxyde d'hydrogène

HVG = hypertrophie ventriculaire gauche

LLLT = low light level therapy

MGD = muscle grand dorsal

NO = oxyde nitrique

NOS = oxyde nitrique synthase

NRFs = nuclear respiratory factors

ONSmt = ONS mitochondriale

PBM = photo-bio-modulation

PGC1- $\alpha$  = peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\alpha$

PGC1- $\beta$  = peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\beta$

PHGPx = phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase

PTDVG = pression télédiastolique du VG

PTFE = polytétrafluoroéthylène

PTPm = pore de transition de perméabilité mitochondriale



QP = débit pulmonaire

QS = débit systémique

RAC = ratio contrôle accepteur

RNS = espèces radicalaires nitrées

ROS = espèces réactives de l'oxygène

SaO<sub>2</sub> = saturation artérielle en oxygène

SOD = superoxyde dismutase

SP = surcharge de pression

VCI = veine cave inférieure

VCS = veine cave supérieure

VES = volume d'éjection systolique

VG = ventricule gauche

# Introduction

### **Contexte :**

Les cœurs univentriculaires représentent 2 à 3% des cardiopathies congénitales. L'histoire naturelle de cette entité nosologique n'est pas compatible avec la vie de l'enfant sans traitement chirurgical. Malgré les progrès médicaux de ces 3 dernières décennies, 20 à 40 % des nouveau-nés décéderont dans les 3 premiers mois de vie, et seulement environ 50% atteindront l'âge de 30 ans. Afin de préserver la vie de l'enfant et de le conduire à l'âge adulte, plusieurs interventions chirurgicales dites palliatives, devront être assurées. La première d'entre elles aura lieu le plus souvent dès la période néonatale, visant à équilibrer les débits systémique et pulmonaire s'il y a lieu. La deuxième étape visera à séparer la circulation veineuse de la circulation systémique, étape qui se réalisera en deux temps chirurgicaux à différents âges de la vie. Ainsi ces patients survivront sur le principe d'une circulation de Fontan, rétablissant une circulation en série, avec un seul ventricule systémique et une circulation pulmonaire dite passive. Le pronostic et la qualité de vie de ces patients seront directement liés au nombre de procédures chirurgicales, mais surtout par la survenue tardive des complications inhérentes à la circulation de Fontan.

Actuellement, seule l'élaboration d'une circulation de Fontan a permis d'améliorer la survie de ces patients. Néanmoins, nous savons que cette circulation n'est que palliative, avant la transplantation cardiaque ou le décès, survenant dans la majorité des cas entre la 30<sup>ème</sup> et 40<sup>ème</sup> année de vie. C'est dans ce contexte que certaines équipes ont tenté une autre stratégie de palliation avec le maintien d'une circulation pulmonaire antérograde, via le ventricule unique couplé à une dérivation cavo-pulmonaire partielle, visant à surseoir à la totalisation de Fontan, ou à la repousser le plus tardivement possible.

Comme nous l'avons souligné, l'élaboration de cette circulation nécessite par ailleurs plusieurs interventions chirurgicales, chacune ayant ses risques et ses désagréments. A ce jour, quelques équipes à travers le monde ont réalisé des procédures de totalisation de Fontan par voie percutanée dans le but de diminuer la morbidité chirurgicale et d'améliorer le confort des patients. Néanmoins les résultats restent médiocres, peu reproductibles et non standardisés. En effet, aucun modèle animal permettant de simuler un cœur univentriculaire n'a pu être conçu jusqu'alors afin d'élaborer une procédure dite hybride « alliant chirurgie et cathétérisme cardiaque » viable, reproductible et sécurisée.

Enfin, toujours dans le but d'améliorer le pronostic de ces patients une cardiomyoplastie atriale visant à générer un flux pulsé pulmonaire avait été réalisé chez l'animal, sans pour autant franchir la phase aiguë de l'expérimentation.

La problématique reste ouverte : comment 40 ans après la description de la procédure de Fontan, pouvons-nous améliorer le pronostic des cœurs univentriculaires ?

**Objectifs :**

Notre objectif est d'améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients ayant une cardiopathie univentriculaire.

Pour ce faire :

- Nous avons déterminé s'il existe une alternative à la circulation de Fontan.
- Et élaboré une procédure de totalisation de Fontan par voie percutanée viable, reproductible et transposable chez l'homme.
- Réalisé une approche énergétique musculaire du cœur sain soumis à un stress et en décharge.
- Essayer de concevoir un tube pulsatile.
- En perspective, optimiser la fonction musculaire d'un cœur univentriculaire, en augmentant son rendement énergétique, et évaluer l'intérêt d'un tube pulsatile travaillant en parallèle ou en potentialisant le rendement énergétique du cœur.

**Quatre approches complémentaires ont été utilisées :**

1- Etude clinique analysant une alternative à la circulation de Fontan.

- Revue de 70 patients avec un ventricule unique pallié par une dérivation cavo-pulmonaire partielle avec conservation d'un flux pulmonaire antérograde (1).

2- Etude expérimentale animale, développant et évaluant la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité d'une procédure hybride de totalisation de Fontan adaptée à la croissance.

- Développement d'un modèle animal permettant de mimer une totalisation de Fontan par voie percutanée (2).
- Etude animale chronique de faisabilité et d'efficacité d'une totalisation de Fontan par voie percutanée extra et intracardiaque (3).
- Etude animale préclinique (en croissance) d'une totalisation de Fontan par voie percutanée extracardiaque (4).

- 3- Etude énergétique animale des capacités oxydatives et de la production des radicaux libres d'un cœur sain (5\*) , soumis à une augmentation de travail (5) et décharge.
  
- 4- Etude de faisabilité d'un tube pulsatile.
  - Etude animale de faisabilité du muscle grand dorsal comme pompe musculaire d'un tube extracardiaque – Prérrogative.
  - Etude de faisabilité hémodynamique ex-vivo des flux générés par un tube extracardiaque.

## Résultats

### 1-

- a. La dérivation cavo-pulmonaire partielle associée à un flux pulmonaire antérograde n'est pas une palliation définitive en présence d'un ventricule unique et la totalisation de Fontan doit être réalisée chez l'homme (1).

### 2-

- a. La réalisation d'un modèle animal ovin par dérivation cavo-atriale supérieure et occlusion de la jonction cavo-atriale native, permet l'étude d'une totalisation de Fontan par voie percutanée (2).
- b. La totalisation de Fontan par voie percutanée chez l'animal, intra ou extracardiaque peut être réalisée de manière sûre, reproductible et sans complication à court terme (3).
- c. Le modèle de pré-conditionnement chirurgical extracardiaque, adapté à la croissance peut être réalisé chez l'homme de manière sûre, reproductible et sans complication à court terme (4).

### 3-

- a. Il existe dans un cœur sain un gradient transmural énergétique « inversement proportionnel » aux contraintes mécaniques, lié probablement au rapport gazeux tissulaire entre le NO et l'oxygène modifiant l'équilibre Nitroso-Redox. Les contraintes « environnementales » agissent négativement sur le métabolisme énergétique et induisent un remodelage ventriculaire réactionnel à la production d'espèce radicalaire (5\*).

- b. L'étude énergétique d'un cœur sain et soumis à des conditions de charges en pression a montré une diminution des capacités oxydatives mitochondriales, une augmentation de la production de radicaux libres et une activation de la biogénèse mitochondriale (5).

#### 4-

- a. Le muscle grand dorsal chez l'ovine peut être utilisé pour générer un flux pulsatile au dépend d'un protocole de pré-conditionnement à l'effort dans le but d'orienter le profil énergétique musculaire vers des fibres lentes.
- b. Un tube extracardiaque, comme utilisé dans la circulation de Fontan, ne peut pas générer un débit pulmonaire pulsé physiologique, aux dépens d'une fréquence supra-physiologique.

### **Conclusion**

La procédure de totalisation de Fontan est, à ce jour, la seule palliation qui garantit la meilleure chance de survie d'un enfant en présence d'un cœur univentriculaire. L'approche hybride, alliant l'expertise chirurgicale et la cardiologie interventionnelle, peut aujourd'hui optimiser la prise en charge de ces patients en termes de confort sans que nous ayons la garantie d'un bénéfice à long terme d'une telle procédure.

L'approche énergétique nous permet d'entrevoir qu'il existe des mécanismes adaptatifs à la diminution de la fonction mitochondriale, soumis à une surcharge en travail. Cet équilibre est en partie perturbé par la production d'espèce radicalaire. Différentes approches thérapeutiques pourraient stabiliser ou régénérer les capacités oxydatives cellulaires en augmentant le rendement énergétique, tout en contrôlant les effets délétères de la production d'espèce radicalaire. Ce champ d'investigation est encore vierge et pourrait faire l'objet ces prochaines années d'avancées dans l'optimisation de la fonction d'un cœur univentriculaire.

L'utilisation du muscle grand dorsal pour réaliser un tube extracardiaque pulsatile est réalisable, néanmoins les propriétés oxydatives et mécaniques de ce muscle ne permettent pas de concevoir un modèle viable à moyen ou long terme. Un tube extracardiaque valvé ne sera sûrement pas suffisante pour assurer un débit pulmonaire efficace sans une fréquence supra-cardiaque. Ainsi la conception d'un tube pulsatile

afin d'optimiser la fonction d'un cœur univentriculaire, nécessitera d'une part d'augmenter son rendement énergétique, et d'autre part de repenser sa géométrie.

### **Perspectives**

Nous poursuivons nos travaux sur :

L'effet de la photo-bio-modulation (PBM) sur la régénération cellulaire et musculaire, par optimisation du métabolisme énergétique que ce soit pour un cœur univentriculaire ou dans l'insuffisance cardiaque.

La conception d'un tube pulsatile :

Modélisation d'un tube garantissant un débit pulmonaire physiologique basé sur le cycle respiratoire.

Elaboration d'un protocole de pré-conditionnement musculaire visant à augmenter les capacités oxydatives du muscle grand dorsal.

Analyse de la fonction d'un muscle pédiculé adhérent à une structure décellularisée.

### **Publications issues de ce travail**

- (1) Gerelli S, Boulitrop C, van steenberghe M, Maldonado D, Bojan M, Raisky O, Sidi D, Vouhé PR. Bidirectional cavopulmonary shunt with additional pulmonary blood flow: failed or successful strategy? Eur J Cardiothorac Surg. 2012 Sep;42(3):513-9
- (2) Gerelli S, van steenberghe M, Patel M, Van Aerschot I, Boudjemline Y. Feasibility of creating a novel animal heart model to test transcatheter techniques for a cavocaval connection that mimics a Fontan completion. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013 Aug;146(2): 108-12.
- (3) Boudjemline Y, Gerelli S, van steenberghe M, Patel M, Malekzadeh-Milani S, Bonnet D. Feasibility of transcatheter techniques for intracardiac and extracardiac cavocaval connection in principle for Fontan completion in chronic animal models. Eur J Cardiothorac Surg. 2013 Apr;43(4):856-60.
- (4) Boudjemline Y, Malekzadeh-Milani S, van steenberghe M, Bögli Y, Patel M, Gaudin R, Bonnet D, Gerelli S. Novel Method of surgical preparation for transcatheter completion of Fontan circulation: creation of an extracardiac pathway. Arch Cardiovasc Diseases (sous press).
- (5) Kindo M, Gerelli S, Bouitbir , Charles AL, Zoll J, Hoang Minh T, Monassier L, Favret F, Piquard F, Geny B. pressure overload-induced mild

cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. *Front physiol.* 2012 Aug;28(3):332.

- (5\*) Kindo M, Gerelli S, Bouitbir J, Hoang Minh T, Charles AL, Mazzucotelli JP, Zoll J, Piquard F, Geny B. Left ventricular transmural gradient in mitochondrial respiration is associated with increased sub-endocardium nitric oxide and reactive oxygen species production. (*Front physiol* sous presse 2016).

### **Communications orales**

- Gerelli S, Boudjemline Y. Totalisation des dérivations cavo-pulmonaires partielles par cathétérisme cardiaque: une étude expérimentale. *Communication libre, 8<sup>ème</sup> journée Alain Choussat, Journée Francophone de cardiopédiatrie. Septembre 2011.*
- Gerelli S, Boulitrop C, Van Steenberghe M, Maldonado D, Bojan M, Raisky O, Sidi D and Vouhé P. Bidirectional cavo-pulmonary shunt with additional pulmonary blood flow: Failed or successful strategy. *25<sup>th</sup> annual meeting European Association for Cardio-Thoracic Surgery. Octobre 2011.*
- Gerelli S, van Steenberghe M, Boudjemline Y. Evaluation à distance d'une totalisation de Fontan par voie percutanée dans un modèle animal survivant. *Communications libres, de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire Juin 2012.*

### **Communications par affiches**

- Gerelli S, van Steenberghe M, Patel M, Malekzadeh-Milani S, Bonnet D, Boudjemline Y. Chirurgie préparatoire et totalisation de Fontan par voie percutanée : évaluation dans un modèle animal en croissance. *Journées présidentielles de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire de langue Française Juin 2013.*
- Gerelli S, Patel M, Malekzadeh-Milani S, van Steenberghe M, Bonnet D, Boudjemline Y. *Novel Method of Surgical Preparation for Transcatheter Completion of Fontan circulation: creation of an extracardiac pathway. Journées Européennes de la Société Française de Cardiologie Janvier 2014.*



# Première partie

## Préambule

# 1 Préambule

## 1.1 Le cœur univentriculaire

### 1.1.1 Principes généraux

Le cœur univentriculaire désigne le concept dans lequel un seul ventricule est fonctionnel. Il représente 2 à 3% des cardiopathies congénitales. L'histoire naturelle de cette entité nosologique n'est pas compatible avec la vie de l'enfant sans traitement chirurgical. Malgré les progrès médicaux de ces 3 dernières décennies, 20 à 40 % des nouveau-nés décèdent dans les 3 premiers mois de vie, et seulement environ 50% atteignent l'âge de 30 ans.

Le cœur univentriculaire a tout d'abord été classé comme composant toutes les anomalies ventriculaires qui ont une chambre unique dans leur masse ventriculaire, ainsi que toutes les anomalies ventriculaires qui possèdent une chambre rudimentaire, par Anderson et al. en 1979 [1]. Plus récemment, il a été défini comme une entité morphologique caractérisée par la présence d'une seule chambre répondant aux critères d'un ventricule (la chambre principale), avec ou sans chambre de sortie rudimentaire coexistant ou poche trabéculaire [2]. Au final, sous le terme de cœur univentriculaire, aujourd'hui nous englobons non seulement, les cœurs connus comme ventricule unique ou cœur univentriculaire (définition anatomique), où une chambre dominante et une hypoplasique sont présentes, et dans lequel une composante d'entrée (double entrée ou une connexion atrio-ventriculaire absente) est présente, mais aussi les cœurs dans lesquels les deux ventricules possèdent toutes les composantes morphologiques, mais où un ventricule est trop petit ou incapable de maintenir la circulation (définition fonctionnelle) [3-5].

Le ventricule unique, ou ventricule à double entrée, se définit comme un ventricule (ou une cavité ventriculaire principale) d'anatomie droite ou gauche, dans lequel s'ouvrent les deux valves atrio-ventriculaires ou une valve atrio-ventriculaire commune [6].

Le but d'une chirurgie palliative en présence d'un cœur univentriculaire, est donc de prendre en compte les facettes physiologique et anatomique, afin de rendre possible la survie de l'enfant.

Le ventricule unique doit assurer à la fois la circulation pulmonaire et la circulation systémique [7] dans un circuit en parallèle. La répartition entre les débits pulmonaire (QP) et systémique (QS), dépend des résistances et pressions que l'on trouve dans chaque système. Le ventricule unique admettant l'ensemble de ces deux circulations, il est donc soumis à une surcharge de volume et de travail. Les circulations cave et pulmonaire étant mélangées, on observe inéluctablement une désaturation du flux sanguin systémique. La saturation en oxygène de ce dernier dépend du débit pulmonaire effectif ainsi que du rapport entre débit pulmonaire et débit systémique (QP/QS).

Ainsi, en la présence d'une malformation congénitale, telle que la présence d'un cœur univentriculaire, la chirurgie visant à établir une circulation de Fontan s'avère être la seule solution pour rétablir une circulation en série. Toutefois, plusieurs interventions chirurgicales dites palliatives, sont nécessaires pour assurer une physiologie compatible avec la vie [8].

### 1.1.2 Conditions d'une circulation univentriculaire optimale

Diverses conditions sont nécessaires pour que les circulations pulmonaire et systémique, en présence d'un cœur univentriculaire, soient optimales :

- Maintien d'un débit pulmonaire satisfaisant, permettant une saturation artérielle en oxygène (SaO<sub>2</sub>) suffisante.
- Eviter l'hyperdébit pulmonaire, engendrant une surcharge volumique du ventricule unique ainsi qu'une élévation des pressions pulmonaires. En effet, cette surcharge volumique cause une augmentation du travail myocardique, dilate le ventricule, et finit par altérer la fonction systolique. Bien sûr, elle peut également être responsable d'une insuffisance fonctionnelle de l'une ou des deux valves atrio-ventriculaires, causant une augmentation des pressions de remplissage et une diminution du gradient de pression transpulmonaire.
- Eviter un quelconque obstacle au niveau de la voie d'éjection systémique, qui provoquerait un hyperdébit pulmonaire.

Il est important de noter que chez les personnes porteuses d'un cœur univentriculaire, le rapport QP/QS doit être compris entre 1 et 1,5 [7, 9]. Cela permet d'obtenir une SaO<sub>2</sub> se situant entre 75 % et 85 %.

Nous pouvons donc dire que la présence d'un ventricule unique n'est pas compatible avec la vie sans que soit assurée un équilibre physiologique entre les circulations pulmonaire et systémique. Ainsi, lorsque la réparation bi-ventriculaire n'est pas possible, il convient de créer

une circulation de type Fontan, permettant de séparer les flux pulmonaire et systémique et donc de rétablir une circulation en série.

## 1.2 La circulation de Fontan

Dans une circulation de Fontan le retour veineux systémique est relié aux artères pulmonaires sans l'intervention d'un ventricule, et suppose un flux entièrement passif en direction de la circulation pulmonaire, dont le débit n'est assuré que par la pression veineuse centrale ; celle-ci doit donc rester élevée ( $\geq 15$  mmHg) [10]. En outre, les résistances pulmonaires doivent être basses, tout comme la pression auriculaire gauche.

Ainsi, le débit cardiaque ne dépend plus seulement de la fonction cardiaque mais également du flux transpulmonaire conditionné par les résistances pulmonaires [10].

La circulation de Fontan permet l'obtention d'une normalisation de la saturation artérielle et impacte positivement la surcharge volumique du ventricule.

## 1.3 La chirurgie de Fontan

En 1971, Fontan et Baudet [11] sont les premiers à publier un article décrivant la correction palliative d'une atrésie tricuspide. Cette opération consistait en une anastomose directe entre l'oreillette droite et l'artère pulmonaire, ou en utilisant la cavité accessoire ventriculaire droite.

Depuis cette première description, l'intervention de Fontan a subi de multiples modifications. Toutefois, elle reste encore aujourd'hui, le fondement des différentes techniques utilisées dans la prise en charge des cœurs univentriculaires.

La chirurgie de Fontan nécessite plusieurs temps chirurgicaux, fonction des résistances pulmonaires et laissant au ventricule le temps de maintenir un débit cardiaque compatible avec la vie ; l'objectif est de trouver l'équilibre entre le débit pulmonaire et systémique qui pénalisera le moins longtemps possible le travail myocardique du ventricule unique et la compliance du lit pulmonaire [11, 12].

La première d'entre elle a le plus souvent lieu dès la période néonatale, visant à équilibrer les débits systémique et pulmonaire s'il y a lieu, que ce soit par la réalisation d'une anastomose systémico-pulmonaire ou d'un cerclage pulmonaire.

La deuxième étape vise à séparer la circulation veineuse de la circulation systémique. Cela se réalise en deux temps chirurgicaux à différents âges de la vie.

### 1.3.1 Premier temps chirurgical dans la conception d'une circulation de Fontan

Le premier temps chirurgical consiste en une anastomose entre la veine cave supérieure et l'artère pulmonaire, ce que l'on nomme dérivation cavo-pulmonaire partielle (DCPP) ou Glenn bidirectionnel. Celui-ci a généralement lieu entre le 4<sup>ème</sup> et 6<sup>ème</sup> mois de vie. Cette intervention permet de dériver environ la moitié du flux sanguin désaturé vers les poumons. Ainsi, cela permet d'augmenter la saturation pour atteindre environ 85-90 % et de diminuer la précharge ventriculaire et donc le travail myocardique.

### 1.3.2 Second temps chirurgical

Ce second temps chirurgical est généralement réalisé entre 2 et 4 ans, ou alors plus tard, suivant les équipes en présence d'une voie pulmonaire antérograde par exemple. Elle permet la totalisation de la dérivation cavopulmonaire, dérivation cavopulmonaire totale (DCPT). La veine cave inférieure est alors reliée à l'artère pulmonaire. La saturation en oxygène s'en trouve normalisée.

Au cours des trois décennies écoulées, depuis la description de l'opération de Fontan, la mortalité opératoire a diminué d'environ 20% à approximativement 5%. Cette amélioration des résultats vaut aussi bien pour les techniques de tunnellation intracardiaque [13, 14] que de conduit extracardiaque [13, 15]. Les facteurs qui ont contribué à l'amélioration des résultats sont la conception de circuits plus économes en énergie avec l'utilisation d'une tunnellation latérale [16] ou d'un conduit extracardiaque [17], la réduction des temps de clampage et de la circulation extracorporelle, ces deux derniers pouvant parfois être évités avec la technique extracardiaque [18].

Sur le long terme, l'étude réalisée par Fontan et al. [19], montre une survie à 1 mois, 1 an, 5, 10 et 15 ans, qui était respectivement de 90%, 87%, 86%, 84% et 74%. Plus récemment, grâce à l'introduction de la tunnellation latérale, la survie à 5 et 10 ans était respectivement de 93% et 91% [14]. Khairy et al. [20] ont même observé un taux survie de 83% et 70%, à respectivement 20 et 25 ans.

Actuellement, il est bien établi que la tunnellation extracardiaque possède de nombreux avantages par rapport à une procédure intracardiaque, et ce pour de multiples raisons. En effet, une totalisation par voie intracardiaque engendre une mortalité opératoire plus élevée, nécessite une circulation extracorporelle et un clampage aortique. Par ailleurs, inhérent à la technique chirurgicale, lié aux lignes de suture atriale et à sa dilatation ultérieure,

il se produit d'avantage d'arythmies postopératoires précoces et tardives. Le risque d'accident vasculaire cérébral, ainsi que la formation de thrombus au niveau de la cloison veineuse, sont également supérieurs [21]. Actuellement, de nombreux patients doivent subir une conversion de Fontan, c'est à dire passer d'une circulation intra- à extracardiaque en présence d'une dilatation des cloisons atriales (ou d'anomalie rythmique, thrombotique), occasionnant des pertes d'énergie manifestes et provoquant une dysfonction de la circulation de Fontan [22-24].

La réalisation d'une circulation de Fontan, nécessite obligatoirement des interventions chirurgicales répétées, augmentant la morbidité, ainsi que la mortalité, et impactant significativement la qualité de vie des patients, avec une faible réserve cardiorespiratoire [25, 26]. Qui plus est, se pose toujours la question du temps le plus optimal de cette totalisation, de la nécessité d'une fenestration entre les deux circulations. Cette intervention pourrait donc être améliorée dans sa conception, par une approche hybride, alliant chirurgie et cathétérisme interventionnel. Elle permettrait également de gérer plus simplement l'adaptation physiologique entre les flux systémique et pulmonaire, afin de réaliser une transition progressive d'une circulation en parallèle vers une circulation en série.

La dysfonction de la circulation de Fontan est généralement divisée en 3 catégories distinctes : la dysfonction myocardique du ventricule unique, les complications systémiques liées à la physiologie propre d'une telle circulation et l'insuffisance chronique d'une circulation de Fontan [8].

- Dans une analyse réalisée auprès de 546 enfants ayant subi une chirurgie de Fontan, 27% avaient des fractions d'éjection ventriculaire anormales et 72% avaient un dysfonctionnement diastolique [27]. La prévalence du dysfonctionnement ventriculaire systolique et diastolique continue d'augmenter lors de la vie adulte [28, 29]. L'hypoxémie chronique et la charge volumique ventriculaire précoces dans la vie pourraient être responsable du dysfonctionnement plus ou moins précoce du myocarde.
- Les complications systémiques liées à la physiologie propre d'une circulation de Fontan sont nombreuses et variées. Nous retrouvons : une difficulté à prendre du poids au cours de l'enfance, pouvant être l'indicateur d'un débit cardiaque non optimal ; une cyanose liée à une potentielle fenestration ; une dysfonction hépatique due à une pression veineuse hépatique 3 à 4 fois supérieure à la normale; des anomalies de coagulation ; une entéropathie exsudative ; une bronchectasie, qui est toutefois rare, se

retrouvant chez moins de 1% à 2% des patients opérés [30] ; des ascites dues à une pression atriale droite élevée; des arythmies notamment dues à une dysfonction du nœud sinusal, avec une prévalence de 40% [20, 31].

- La physiologie d'une circulation de Fontan est notamment caractérisée par une diminution progressive du débit cardiaque, et une augmentation de la pression veineuse centrale au fil du temps, l'ensemble conduisant à une diminution du pic de consommation en oxygène, au fur et à mesure des années, amenant les patients vers une défaillance circulatoire.

Il semble également nécessaire de se pencher sur la qualité de vie de ces patients. Divers auteurs rapportent une qualité de vie générale altérée [32-36], et plus précisément une diminution des capacités physiques, évaluées par questionnaire ou test d'effort incrémental [33-36], cognitives (vitesse de cognition) et mentales (telles que perçues par les patients), également évaluées par un test ou un questionnaire [32, 36], un fonctionnement social (également autoévalué par questionnaire) [35], et des capacités scolaires [35] altérés. Il est aussi observé une augmentation des états dépressifs [34] et des douleurs corporelles ressenties [33]. Nous pouvons donc dire, malgré le fait que la conception d'une circulation de Fontan soit indispensable à la survie, que sa réalisation engendre de multiples troubles physiques et mentaux, altérant de fait la qualité de vie des patients.

Ainsi, l'optimisation de la prise en charge des cœurs univentriculaires, passera par une amélioration de la technique de conception d'une circulation de Fontan, qui se devra moins invasive, adaptée au régime de pression ; mais également par une approche énergétique, visant à préserver les capacités myocardiques du ventricule unique dans le temps ou en restaurant un débit pulmonaire pulsé.

## 1.4 La chirurgie Hybride

Nous avons vu que la réalisation d'une circulation de Fontan nécessite plusieurs interventions chirurgicales avec leurs taux de morbi-mortalités, inhérent à toutes procédures. Par ailleurs, il existe deux techniques pour la réalisation d'une circulation de Fontan, la tunnellation latérale et la circulation extracardiaque, chacune possédant des avantages et des inconvénients.

Les avantages de la tunnellation latérale sont le potentiel de croissance du montage, et sa facilité de réalisation. Les inconvénients sont la survenue de possibles arythmies, secondaires à des pressions atriales accrues, la dilatation du circuit avec une perte de l'écoulement laminaire au fil du temps, et la nécessité d'un clampage aortique avec les risques que cela représente pour le myocarde [37].

Les avantages de la circulation extracardiaque sont l'établissement d'un écoulement laminaire stable, l'absence des lignes de suture atriale arythmogènes, ainsi que la possibilité de créer le circuit sans clampage aortique. Les inconvénients sont la nécessité d'utiliser un tube de taille adulte chez l'enfant avec une distorsion potentielle des artères pulmonaires et un risque thromboembolique [37].

De fait, il s'est avéré nécessaire de travailler sur de nouvelles solutions pour faire face à ces désagréments. Cela a été rendu possible grâce à l'amélioration des techniques d'imagerie interventionnelle et de la chirurgie.

Ainsi, a été avancé le concept de chirurgie hybride pouvant se définir comme une procédure combinant des éléments de la chirurgie conventionnelle et de cathétérisme interventionnel [38]. Cette dernière se révélant beaucoup moins invasive que les procédures classiques, la morbidité s'en trouve donc diminuée. Par ailleurs, le développement de techniques moins invasives nous permet de repenser la stratégie de totalisation afin de mieux contrôler la gestion des flux pulmonaire et systémique, au profit du travail myocardique du ventricule unique.

A ce jour, quelques équipes à travers le monde, dont les pionniers furent Konertz et al. [39], ont réalisé des procédures de totalisation de Fontan par voie percutanée dans le but de diminuer la morbidité chirurgicale et d'améliorer le confort des patients.

Hausdorf et al. [40] ont décrit la totalisation par voie percutanée d'un héli-Fontan ou DCPP, en utilisant une dilatation par ballonnet de la jonction cavo-atriale « bague » et la fermeture de la fenestration cavo-atriale, en utilisant, soit un stent couvert, soit un obturateur de canal artériel. Ensuite, Klima et al. [41] ont développé une nouvelle approche en établissant une circulation de Glenn bidirectionnelle et un cerclage partiel à la jonction cavo-atriale supérieure, en plaçant une manchette en polytétrafluoroéthylène (PTFE).



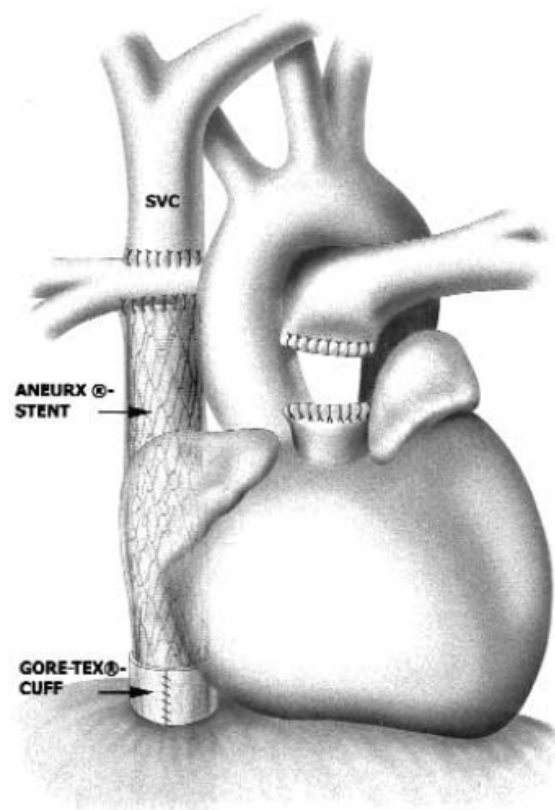


Figure 1 – Procédure interventionnelle de Klima et al.

Pour faciliter le placement du stent à la jonction veine cave supérieure (VCS)-atrium droit (AD), et pour éviter une obstruction résiduelle autour du cerclage partiel de la VCS, Galantowicz et Cheatham [37, 42] ont fermé la jonction VCS-AD en utilisant un patch péricardique, et insérer un stent intracardiaque.

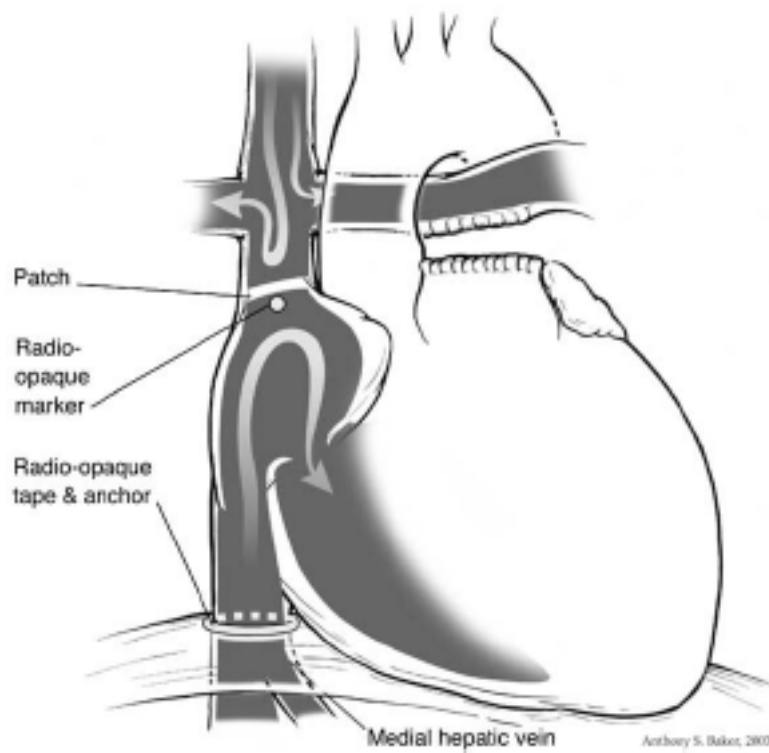


Figure 2 – Procédure interventionnelle de Galantowicz et al.

Konstantinov et al. [43, 44] ont amélioré cette technique en plaçant des stents au niveau des jonctions cavo-atriales. La VCS atriale était ensuite connectée à la face inférieure de l'artère pulmonaire (AP) qui n'était pas ouverte. Le stent à la jonction VCS-AP pouvait couvrir en partie la lumière de l'AP, et ainsi réduire le flux sanguin pulmonaire. L'énergie cinétique étant la seule force entraînant le sang dans un circuit pulmonaire à faible résistance, une quelconque perte d'énergie à ce niveau compromet la précharge ventriculaire et le débit systémique.

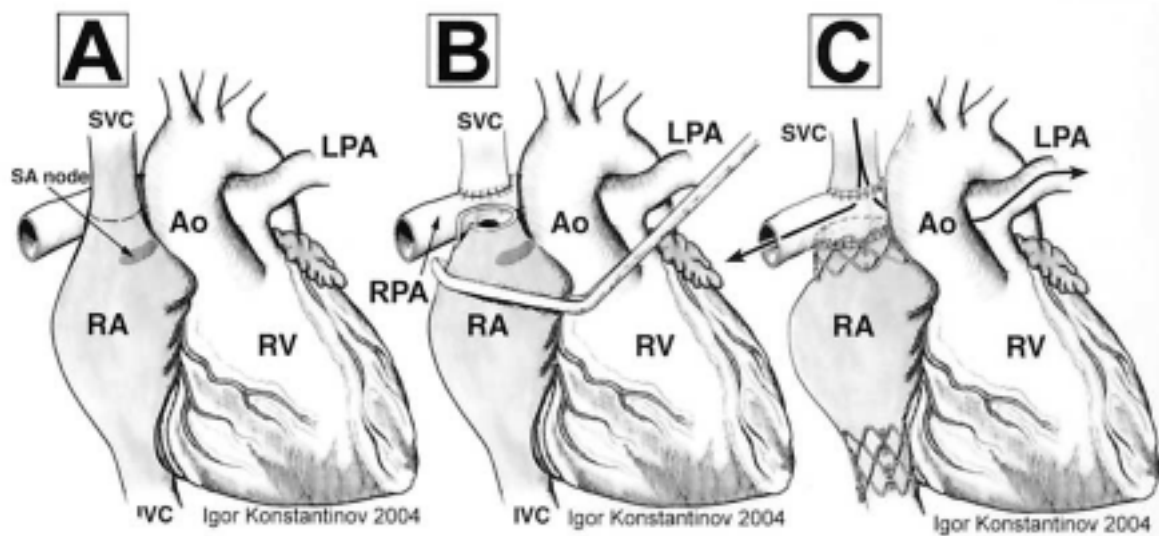


Figure 3 – Procédure interventionnelle de Konstantinov et al.

Etape 1 : Pré-conditionnement chirurgicale. La veine cave supérieure (SVC) est mobilisée et sectionnée au-dessus du nœud sinusal (SA node) (A). La VCS est anastomosée à l'artère pulmonaire droite (RPA). Avec l'atrium droit (RA) clampée sous le nœud sinusal, la terminaison proximale de la VCS est élargie (B) et anastomosée à l'artère pulmonaire droite (C). Après la réalisation d'une DCCP, 2 stents sont placés autour des jonctions atrio-caves (C). Ao, Aorte ; LPA, Artère pulmonaire gauche ; RV, Ventricule droit ; IVC, Veine cave inférieure.

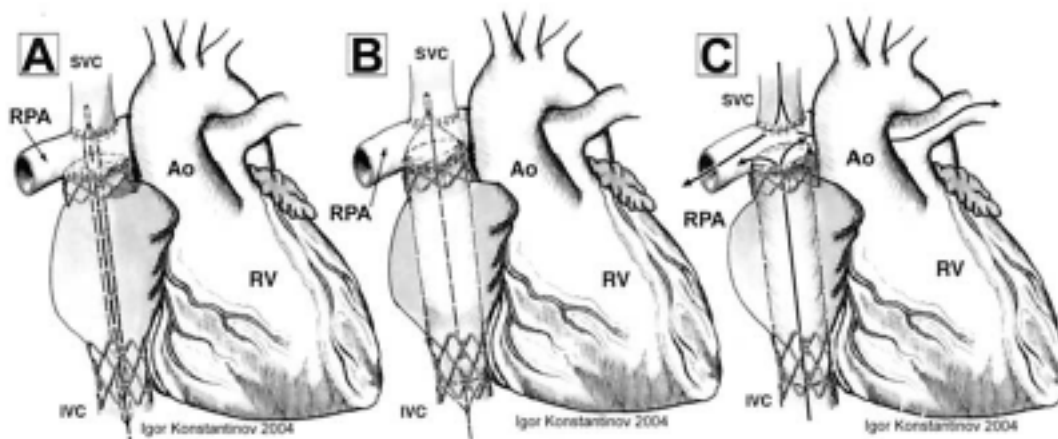


Figure 4 - Procédure interventionnelle de Konstantinov et al.

Etape 2 : Totalisation par cathétérisme interventionnelle. Le cathéter est introduit dans l'atrium droit (RA), et l'artère pulmonaire droite (RPA) est perforée (A). Un stent couvert est placé contre les stents supérieur et inférieur (B). Le flux sanguin de la veine cave inférieure (IVC) est détourné vers la circulation pulmonaire, au moyen des stents couverts (C). Ao, Aorte ; LPA, Artère pulmonaire gauche ; RV, Ventricule droit ; SVC, Veine cave supérieure.

Les résultats actuels chez l'homme restent médiocres, peu reproductibles et non standardisés. Aucun modèle animal permettant de simuler un cœur univentriculaire n'a pu être conçu jusqu'alors, afin d'élaborer une procédure dite hybride, « alliant chirurgie et cathétérisme cardiaque », viable, reproductible et sécurisé.

Toutefois, il semblerait que l'apport des progrès de l'imagerie et des techniques de cathétérisme interventionnel dans la réalisation d'une circulation de Fontan puissent contribuer à améliorer le pronostic et la qualité de vie des patients porteur d'un cœur univentriculaire.

## 1.5 Approche énergétique

(Rappel commun EA 3072)

### 1.5.1 Energétique musculaire : fonction mitochondriale et stress oxydant

La mitochondrie est un organite riche en composants biochimiques dont le rôle majeur est la production d'énergie [45-47]. En plus d'assurer l'approvisionnement cellulaire en énergie, les mitochondries ont d'autres rôles vitaux pour le bon fonctionnement de la cellule. Elles participent à l'homéostasie calcique, à la régulation du pH intracellulaire, à la synthèse d'hormones stéroïdes, ainsi qu'à la régulation de la thermogenèse. De plus, elles constituent un des principaux sites de production des radicaux libres jouant un rôle clé dans plusieurs voies de signalisation intracellulaire.

Les mitochondries occupent environ 30 à 40% du volume de la cellule cardiaque. Les muscles squelettiques ont par contre un contenu variable en mitochondries. Elles peuvent occuper 1% du volume cellulaire dans les muscles glycolytiques, et jusqu'à 6 - 30% du volume cellulaire dans les muscles oxydatifs.

#### 1.5.1.1 Structure des mitochondries

La mitochondrie est un organite hautement spécialisé dans la transformation d'énergie, elle est de forme longitudinale, et contient deux membranes : la membrane externe et la membrane interne, délimitant un espace inter-membranaire et une matrice. Les replis caractéristiques de la membrane interne sont appelés crêtes mitochondriales (Figure 5).

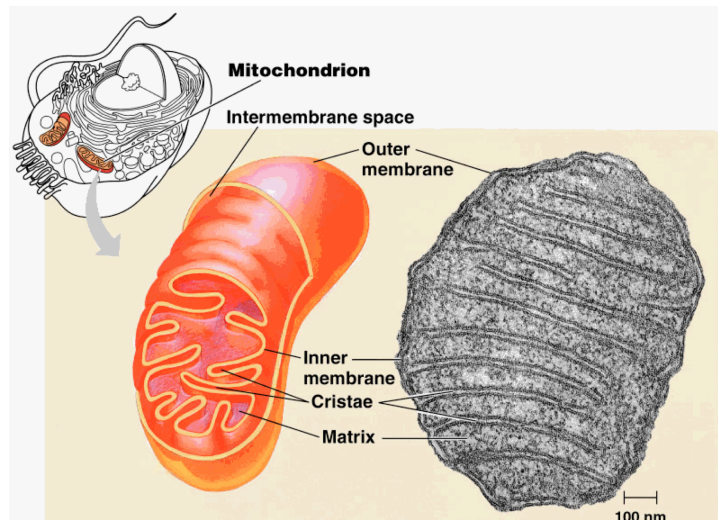


Figure 5 – Structure d'une mitochondrie

#### 1.5.1.1.1 La membrane externe

C'est une membrane rigide dans laquelle un nombre important de protéines sont enchâssées. Ces protéines permettent les échanges entre le cytosol et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie en formant des pores qui autorisent d'une part la translocation de protéines, et permettent d'autre part les échanges de métabolites de petits poids moléculaires via des porines. La porine, également appelée voltage dépendant anion channel, est la principale voie par laquelle transitent les métabolites régulant la respiration mitochondriale.

#### 1.5.1.1.2 L'espace inter-membranaire

L'espace inter-membranaire se situe entre les deux membranes et contient des protéines qui jouent un rôle majeur dans l'énergétique mitochondriale et la mort cellulaire [48, 49].

#### 1.5.1.1.3 La membrane interne

La membrane interne présente une perméabilité réduite et sélective, elle forme la barrière la plus distincte entre le cytosol et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité sélective permet de maintenir un gradient de concentration pour les protéines, les ions et les métabolites.

Des transporteurs permettent les échanges entre les compartiments et participent au bon fonctionnement de la mitochondrie. Ces transporteurs sont représentés par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, l'Adenine Nucleotide Translocator (ANT), et par les protéines découplantes :

- Les complexes de la chaîne respiratoire sont ancrés dans la membrane interne. Ils assurent le maintien du gradient de protons et la formation d'ATP.
- L'ANT est constitué de deux sous-unités de 32 kDa et d'un site unique de liaison à l'ATP ou l'ADP. Selon sa conformation, l'ANT fait face, alternativement, à la matrice ou à l'espace inter-membranaire. L'ATP mitochondriale est échangée par l'ADP cytosolique dans un rapport 1:1. L'ANT est exprimé par trois isoformes : ANT1, ANT2 et ANT3. Chez l'Homme, l'ANT1 est l'isoforme exprimée de manière prédominante dans le muscle cardiaque et squelettique, l'ANT2 est ubiquitaire, exprimée dans tous les tissus en quantité variable en fonction de l'activité respiratoire du tissu. L'ANT3 a un faible niveau d'expression dans le cerveau, le foie, le rein, le cœur et les muscles squelettiques.
- Les protéines découplantes sont enchâssées dans la membrane interne et permettent le passage de protons de la matrice à l'espace inter-membranaire. Ce phénomène de fuite induit un couplage incomplet entre les phosphorylations et les oxydations, appelé respiration mitochondriale découplée. Une partie de l'énergie est ainsi perdue sous forme de chaleur. Concernant le rôle physiologique de ce découplage, il se pourrait que cette fuite des protons permette de diminuer la production des radicaux libres par une augmentation de l'oxydation de l'ubiquinone, et donc minimise le stress oxydant et les dégâts inhérents au niveau de l'ADN. Les protéines découplantes joueraient donc un rôle de protection contre le stress oxydant [50].

#### 1.5.1.1.4 La matrice mitochondriale

La matrice est le compartiment interne de la mitochondrie délimité par la membrane interne, et contient des centaines d'enzymes nécessaires au cycle de Krebs et à la  $\beta$ -oxydation des acides gras, ainsi que l'ADN mitochondrial codant pour des protéines composant certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de la chaîne respiratoire, des ribosomes mitochondriaux, des tRNA, des rRNA et des enzymes nécessaires à l'expression de l'ADN.

### 1.5.1.2 Fonctionnement de la mitochondrie

Les voies de dégradation des lipides et des hydrates de carbone se rejoignent au niveau de la mitochondrie avec l'acétyl CoA qui est métabolisé au cours du cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs (Figure 6). A la fin du cycle, une molécule d'acétyl CoA fournira 2 molécules de  $\text{CO}_2$ , 3 molécules de NADH, 1 molécule de  $\text{FADH}_2$  et une molécule d'ATP. Les transporteurs d'hydrogène et d'électrons NADH et  $\text{FADH}_2$ , réagissent ensuite avec les enzymes de la chaîne respiratoire pour réduire l'oxygène en eau et synthétiser de l'ATP : c'est la phosphorylation oxydative, le processus majeur de fourniture d'énergie pour les fibres des muscles squelettiques et cardiaque.

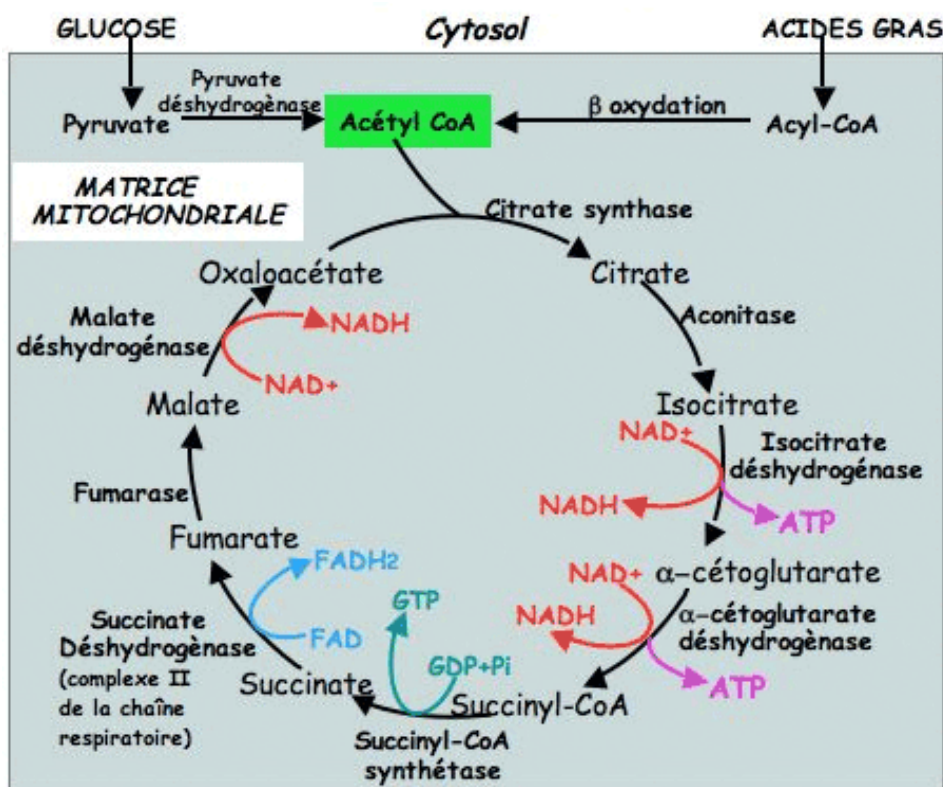


Figure 6 – Le cycle de Krebs

La chaîne de transport des électrons, encore appelée chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 5 complexes :

- le complexe I ou NADH déshydrogénase
- le complexe II ou Succinate déshydrogénase
- le complexe III ou Ubiquinol-cytochrome c réductase
- le complexe IV ou Cytochrome c oxydase
- le complexe V ou ATP synthase.

Les électrons sont ainsi transportés par le NADH et le  $\text{FADH}_2$ , respectivement aux complexes I et II qui transfèrent les électrons à l'ubisemiquinone, cette dernière les acheminant au complexe III. L'arrivée des électrons au complexe IV constitue la fin de la chaîne d'oxydoréduction et entraîne la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Les réactions associées au passage d'un électron au niveau des complexes I, III et IV entraînent le passage d'un proton vers l'espace inter-membranaire à travers les complexes. Ce passage établit un gradient électrochimique de protons qui crée une force proton-motrice utilisée par le complexe V pour phosphoryler des molécules d'ADP en ATP, assurant le couplage de la chaîne des oxydoréductions avec la production d'ATP [51].

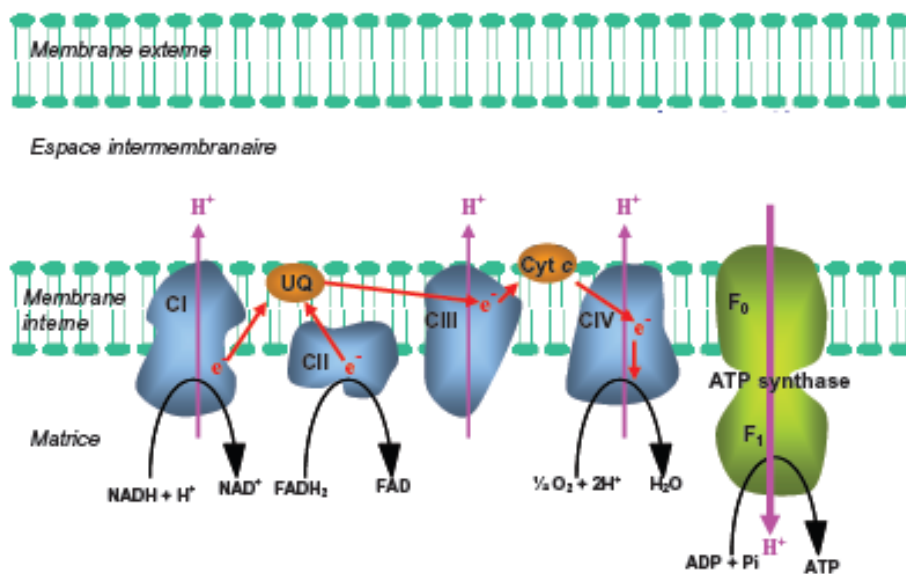


Figure 7 – Chaîne de transport des électrons



#### 1.5.1.2.1 Complexe I : NADH déshydrogénase

C'est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Elle catalyse le transfert de 2 électrons du NADH à l'ubiquinone (ou coenzyme Q10), ce transfert étant couplé à la translocation de 4 protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force proton-motrice. Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités, dont 38 sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons, et neuf centres Fer/Soufre constituant le centre catalytique de l'enzyme. Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe [52, 53].

#### 1.5.1.2.2 Complexe II : Succinate déshydrogénase

Le complexe II joue un rôle important au niveau mitochondrial puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (comme la citrate synthase). Dans ce cas, la succinate déshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter, ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux réverse d'électrons au travers du complexe I, entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de radicaux libres [54].

#### 1.5.1.2.3 Complexe III : Ubiquinol-cytochrome c réductase

Il contient 4 groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b (bL et bH), le cytochrome c1 et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous-unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique. La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b

est codée par le génome mitochondrial. Cette enzyme catalyse le transfert de 2 électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons [55].

#### 1.5.1.2.4 Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Il appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont 3 (Cox I, Cox II et Cox III) sont codées par le génome mitochondrial. Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau. Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace inter-membranaire [55].

#### 1.5.1.2.5 Complexe V : ATP synthase

Elle est composée de 2 sous-complexes (Figure 8). La partie  $F_0$  est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les protons depuis l'espace inter-membranaire vers la matrice. Cette partie, chez les mammifères, est composée de 5 sous-unités (A6, b, c, d et Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). Le segment  $F_1$  est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice versa. Il est composé de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  dans un ratio 3, 3, 1, 1, 1). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie  $F_0$  qui, connectées à la sous-unité  $\gamma$  de  $F_1$ , agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité  $\gamma$  cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie  $F_1$  et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP [56].

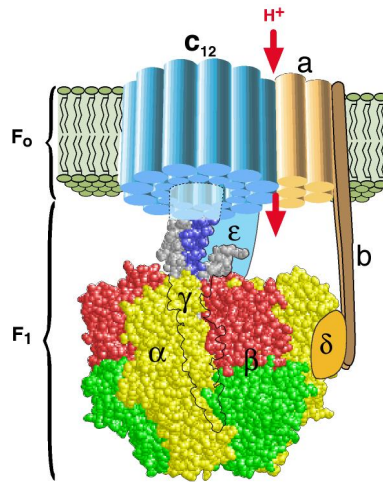


Figure 8 – Structure de l'ATP synthase

### 1.5.1.3 Régulation transcriptionnelle mitochondriale

La mitochondrie possède son propre génome, mais celui-ci ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Les autres protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. Cette double origine des protéines mitochondriales nécessite une régulation fine et coordonnée de leur expression. Par conséquent, il existe des facteurs régulateurs clés codés par le génome nucléaire qui vont permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. Ces facteurs régulateurs sont représentés par le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1  $\alpha$  et  $\beta$ , les nuclear respiratory factors, et le facteur de transcription mitochondriale A.

#### 1.5.1.3.1 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1

Le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\alpha$  (PGC1- $\alpha$ ) est considéré comme un des cofacteurs centraux de la régulation de la biogenèse mitochondriale [57]. La compréhension de la fonction de PGC1- $\alpha$  dans la biogenèse mitochondriale a été améliorée par l'utilisation de modèles animaux présentant un gain ou une perte de fonction de ce facteur. Ainsi, des souris déficientes pour PGC1- $\alpha$  présentent une diminution du nombre de mitochondries et une diminution des capacités oxydatives dans les muscles lents [58]. A l'inverse, la surexpression de PGC1- $\alpha$  résulte en une conversion des fibres rapides du muscle squelettique en fibres lentes [59].

Le peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator  $\beta$  (PGC1- $\beta$ ) est un co-activateur transcriptionnel présentant une forte homologie de structure avec celle de PGC1- $\alpha$ . Le PGC1- $\beta$  coactive en partie les mêmes facteurs de transcription que le PGC1- $\alpha$  pour induire

l'expression de gènes cibles communs tels que les gènes impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial [60].

#### 1.5.1.3.2 Nuclear respiratory factors

Les nuclear respiratory factors (NRFs) sont représentés par le NRF1 et le NRF2. Ce sont des éléments majeurs des processus de biogenèse mitochondriale. Ils régulent en aval la réplication et la transcription mitochondriale permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct [61].

#### 1.5.1.3.3 Facteur de transcription mitochondriale A

Le facteur de transcription mitochondriale A (TFAM) assure un rôle de facteur de transcription, mais est également indispensable au maintien et à la réplication du génome mitochondrial. Ainsi, les facteurs NRF1, NRF2 et le TFAM sont requis pour la réplication de l'ADN mitochondrial [61-63].

*En résumé,*

*La production d'énergie aérobie dans le muscle est dépendante de la capacité à produire de l'ATP lors du processus de phosphorylation oxydative qui se déroule à l'intérieur de la mitochondrie. Au cours de la phosphorylation oxydative, des électrons sont transférés de molécules réductrices vers des oxydants tels que l'oxygène au cours de réactions d'oxydoréduction. Ce sont ces réactions redox qui libèrent de l'énergie, utilisée pour former des molécules d'ATP. Ces réactions sont réalisées par une série de complexes protéiques situés dans la membrane interne des mitochondries, formant la chaîne respiratoire. L'énergie libérée par la circulation des électrons le long de la chaîne respiratoire sert à pomper des protons à travers la membrane mitochondriale et générer un gradient électrochimique et un gradient de pH à travers cette membrane. Les protons, en s'accumulant, accroissent la pression chimiosmotique par rapport à celle qui règne à l'intérieur de la mitochondrie. En retournant à l'intérieur de la mitochondrie, ils passent à travers le canal ionique de l'ATP synthase, enzyme complexe qui utilise l'énergie chimiosmotique de ces protons pour permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP.*

*La biogenèse mitochondriale est régulée par de nombreux co-activateurs, tels que les PGC1 $\alpha$  et  $\beta$ , les NRFs, et le TFAM. Ces co-facteurs sont au centre d'un système complexe de régulation du métabolisme énergétique, en régulant l'expression de gènes liés à de nombreuses fonctions métaboliques impliquées dans la réponse aux besoins énergétiques cellulaires.*

## 1.5.2 Le stress oxydant

Les organismes multicellulaires possèdent des réseaux complexes de signalisation intra- et extra-cellulaire qui contrôlent et harmonisent les fonctions cellulaires dans les différents processus physiologiques tels que l'organogenèse, l'intégrité et l'homéostasie tissulaire, ainsi que la réponse aux événements pathologiques.

Les radicaux libres de l'oxygène (ROS) produits par les cellules ont été traditionnellement considérés comme des produits toxiques du métabolisme. Le stress oxydant intracellulaire peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La capacité à éliminer les ROS est appelée capacité antioxydante de la cellule, et permet d'empêcher les lésions oxydatives.

### 1.5.2.1 Différentes formes de radicaux libres

Un radical libre est une espèce chimique, atome ou molécule, contenant un électron non apparié. Extrêmement instable, ce composé peut réagir avec les molécules les plus stables pour appairer son électron. Il peut soit arracher un électron (se comportant comme un oxydant), soit en céder un (agissant alors comme un réducteur). Cette première réaction conduit généralement à la formation en chaîne de nouveaux radicaux ; ceci explique que la production d'un premier radical libre puisse causer d'importantes lésions dans une cellule.

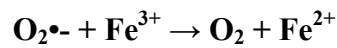
L' $O_2$  est une molécule biradicalaire formée de deux atomes présentant sur leurs orbitales externes deux électrons non appariés. Il est donc susceptible de capter facilement 1 puis 2 électrons pour être partiellement réduit en anion superoxyde :  $O_2^{\bullet-}$ , puis en peroxyde d'hydrogène :  $H_2O_2$ . Il est ainsi à l'origine de la formation des ROS.

L'appellation ROS inclut les radicaux libres dérivés de l'oxygène : anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) mais aussi certains dérivés oxygénés non radicalaires dont la toxicité est importante tel que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ).

L'anion superoxyde ( $O_2^{\bullet-}$ ) est un radical chargé négativement provenant de la réduction monovalente de l'oxygène moléculaire qui capte un électron. La dismutation de cet  $O_2^{\bullet-}$  entraîne la formation d'oxygène fondamental et de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). L' $H_2O_2$  n'est pas un radical libre au sens propre mais il est extrêmement réactif et possède un fort pouvoir oxydant. De plus, sa capacité à traverser les membranes biologiques fait qu'il peut se retrouver à une grande distance de son lieu de production. Selon la réaction de Fenton, l' $H_2O_2$  se décompose, en présence d'ions ferreux ( $Fe^{2+}$ ), en un ion  $OH^-$  et un radical hydroxyle ( $OH^{\bullet}$ ) :



Cette réaction s'interrompt rapidement par épuisement du fer ferreux, excepté en présence d'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) qui régénère le  $\text{Fe}^{3+}$  en  $\text{Fe}^{2+}$  selon la réaction d'Haber-Weiss :



Ainsi, la présence simultanée de peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), d'anion superoxyde ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) et de fer permet la production de radical hydroxyle ( $\text{OH}\cdot$ ). L' $\text{OH}\cdot$ , avec une demi-vie de l'ordre de la nanoseconde, est la plus instable et la plus réactive de toutes les espèces dérivées de l'oxygène. La diffusion limitée de ce radical lui permet de réagir avec de nombreuses espèces moléculaires se trouvant à proximité (protéines, lipides, ADN) entraînant ainsi de multiples dommages cellulaires. L' $\text{OH}\cdot$  apparaît comme l'espèce radicalaire ayant un rôle majeur dans la cytotoxicité des ROS.

#### 1.5.2.2 Source cellulaire de radicaux libres

Dans l'organisme, il existe de nombreuses sources de ROS parmi lesquelles la xanthine oxydase et la NADPH oxydase, le réticulum endoplasmique, les peroxysomes et les mitochondries.

##### 1.5.2.2.1 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $\text{O}_2^{\bullet-}$  [64].

##### 1.5.2.2.2 La NADPH oxydase

La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes [65]. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d' $\text{O}_2^{\bullet-}$  au niveau des vaisseaux. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire [66].

#### 1.5.2.2.3 Le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques [67]. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS [68]. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.

#### 1.5.2.2.4 Les peroxysomes

Les peroxysomes sont une importante source de production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cellulaire [69]. Toutefois, l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.

#### 1.5.2.2.5 La mitochondrie

La principale source de ROS est la mitochondrie et plus précisément au niveau de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires [70].

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS, et près de 3% de l'oxygène utilisé par la mitochondrie est incomplètement réduit et produit des ROS [71]. Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%) [72].

### 1.5.2.3 Systèmes antioxydants

Les radicaux libres sont produits spontanément et de manière continue au sein de notre organisme. Le maintien d'un niveau non cytotoxique de ROS est assuré par des systèmes antioxydants. Un déficit ou un dysfonctionnement de ces systèmes engendre une augmentation des dommages tissulaires. Les antioxydants sont des systèmes enzymatiques ou non-enzymatiques [73].

#### 1.5.2.3.1 Systèmes antioxydants enzymatiques

Les antioxydants enzymatiques sont considérés comme la première ligne de défense contre les ROS. Ces antioxydants enzymatiques sont représentés par la superoxyde dismutase, la glutathion peroxydase, la glutathion réductase, et la catalase (Figure 9).



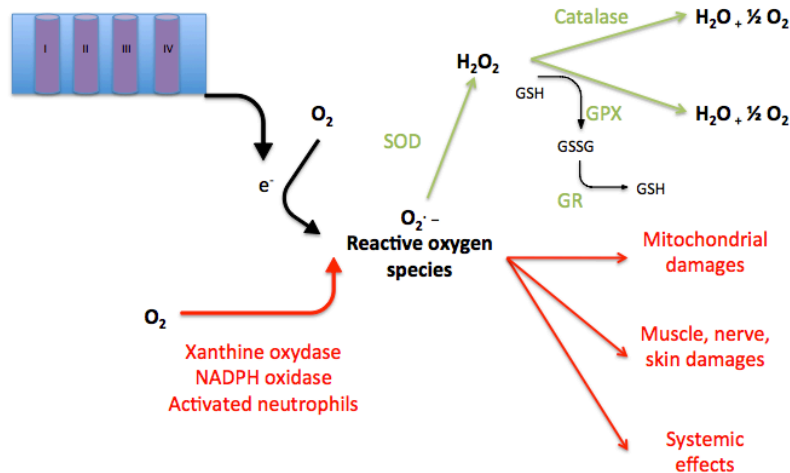


Figure 9 – Radicaux libres et antioxydants enzymatiques

La superoxyde dismutase (SOD) catalyse la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$ . La SOD existe sous trois isoformes qui se différencient par leur localisation cellulaire et par leur cofacteur métallique : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (Cu/Zn-SOD ou SOD1), une forme mitochondriale associée au manganèse (Mn-SOD ou SOD2) et une forme extracellulaire (EC-SOD ou SOD3). Il a été montré que la Cu/Zn-SOD était également présente dans l'espace inter-membranaire. La distribution de ces différentes isoformes varie selon le tissu. Dans le muscle, environ 65 à 85% de l'activité de la SOD se trouve dans le cytosol tandis que les 15 à 35% restants sont localisés dans les mitochondries. La glutathion peroxydase (GPX) agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et  $O_2$ . Lors de cette réaction deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en glutathion-disulfure (GSSG). Il existe également une glutathion peroxydase associée à la membrane mitochondriale, la phospholipide-hydroperoxyde glutathion peroxydase (PHGPx) qui est spécifiquement impliquée dans la diminution de la peroxydation lipidique [73].

La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons. En effet, la concentration cellulaire en glutathion étant limitée, il est nécessaire de la réduire constamment pour que la GPX maintienne sa fonction. La GPX et la GR sont présentes dans le cytosol et dans les mitochondries.

La catalase est également responsable de l'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par une transformation en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$ . Contrairement à la GPX, l'affinité de la catalase pour l' $\text{H}_2\text{O}_2$  est élevée seulement lorsque les teneurs en peroxyde d'hydrogène sont accrues [73]. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol.

#### 1.5.2.3.2 Systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart des systèmes antioxydants non enzymatiques ne sont pas synthétisés par l'organisme et sont apportés par l'alimentation : il s'agit des oligoéléments, du glutathion réduit (GSH), de l'ubiquinone, du cytochrome c et des vitamines E et C.

Les oligoéléments antioxydants sont le cuivre (Cu), le zinc (Zn), le manganèse (Mn), le sélénium (Se) et le fer (Fe) sont des métaux essentiels dans la défense contre le stress oxydant. Toutes les enzymes antioxydantes requièrent un cofacteur pour maintenir leur activité catalytique. Ainsi, la SOD mitochondriale a besoin de manganèse, la SOD cytosolique de cuivre et de zinc, la catalase de fer et la GPX de sélénium. Cependant, certains oligoéléments, notamment le fer, lorsqu'ils sont en excès dans l'organisme et sous leur forme réduite, peuvent avoir une action pro-oxydante.

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPX). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique [73].

Il a été décrit précédemment que les ubiquinones, sous leur forme semi-radicalaire, jouaient un rôle fondamental dans la production de ROS. Inversement, il a pu être défini que la forme "ubiquinol" agissait comme antioxydant. L'ubiquinol protège les membranes de la peroxydation lipidique par une diminution de la formation et de la propagation de radicaux peroxy. L'ubiquinone est également impliquée dans la régénération de la vitamine E ce qui amplifie son rôle protecteur contre les ROS [74].

Le cytochrome c présent dans l'espace inter-membranaire a un rôle de détoxification en captant l'électron libre de l' $\text{O}_2\bullet^-$  produit au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi réduit, il cède cet électron au complexe IV formant du cytochrome c oxydé et de l' $\text{H}_2\text{O}$ .

Les vitamines E ( $\alpha$ -tocophérol) et C (acide ascorbique) semblent être des plus importantes dans la lutte contre le stress oxydant. La vitamine E étant liposoluble, elle se fixe aux membranes et peut ainsi séquestrer les radicaux libres empêchant la propagation des réactions de peroxydation lipidique. La vitamine C, hydrosoluble, se trouve dans le cytosol et

dans le fluide extracellulaire ; elle peut capter directement l' $O_2^{\bullet-}$  et l' $OH^{\bullet}$ . Elle peut aussi réduire le radical  $\alpha$ -tocophérol et ainsi permettre une meilleure efficacité de la vitamine E [74].

#### 1.5.2.4 Dommages cellulaires

Les dommages induits par le stress oxydant correspondent à la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines, et des mutations de l'ADN. Ces altérations peuvent conduire à des pertes de fonction et d'intégrité de la cellule, voire à l'apoptose, en activant l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTPm).

##### 1.5.2.4.1 Peroxydation lipidique

Les premières cibles des ROS sont les lipides, notamment ceux présents dans les membranes cellulaires. Les membranes riches en acides gras polyinsaturés sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation. L'oxydation des lipides génère des peroxydes lipidiques qui sont eux-mêmes très réactifs. La peroxydation de lipides induit une modification de la fluidité, de la perméabilité et de l'excitabilité des membranes. Elle fournit également une grande variété de produits qui peuvent réagir avec les protéines [75].

##### 1.5.2.4.2 Oxydation des protéines

De façon comparable à l'oxydation des lipides, les protéines sont aussi susceptibles d'être oxydées par les ROS. Ces réactions d'oxydation peuvent être classées en deux catégories : celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique d'une part, et celles qui modifient les peptides par l'addition de produits issus de la peroxydation lipidique d'autre part. Ces changements sont tels qu'ils conduisent à une modification structurale des protéines dont les conséquences sont majeures : perte de fonction catalytique, augmentation de la sensibilité aux protéases [76].

##### 1.5.2.4.3 Dommages de l'ADN

Le stress oxydant étant principalement d'origine mitochondriale, les mitochondries sont ainsi les premières cibles des ROS. En effet, le génome mitochondrial présente une susceptibilité au stress oxydant qui est 10 fois supérieure à celle du génome nucléaire. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette situation :

- l'absence d'histones protectrices autour de l'ADN mitochondrial
- la localisation de l'ADN mitochondrial proche de la membrane interne
- des mécanismes de réparation frustrés

- une structure circulaire sans intron, ce qui augmente le risque de mutations pathogènes.

L'idée d'un « cercle vicieux » est avancée pour expliquer les altérations mitochondriales dans certaines pathologies : des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire pourraient augmenter la production de ROS et induire ainsi une augmentation progressive des mutations du génome mitochondrial et des protéines synthétisées. Comme le génome mitochondrial code pour quelques sous-unités de protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative (7 sous-unités du complexe I, 1 du complexe III, 3 du complexe IV et 2 de l'ATP synthase), leur défaut d'expression pourrait exacerber la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au profit de la production de ROS. Ainsi, plus la fuite d'électrons est importante, plus la formation de ROS provoquant de nombreuses mutations mitochondriales aggraverait ce phénomène [77].

#### 1.5.2.4.4 Apoptose par ouverture du pore de transition de perméabilité

Les fonctions de la mitochondrie sont donc particulièrement exposées aux dommages oxydatifs provoquant principalement une diminution de la synthèse d'ATP mais engageant également la cellule dans un programme de mort cellulaire par apoptose avec l'induction de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm).

Succinctement, l'ouverture du PTPm provoque un gonflement mitochondrial résultant de l'entrée dans la matrice de composés osmotiquement actifs. Suite à ce gonflement, la membrane externe peut se rompre et entraîner la sortie de molécules pro-apoptotiques comme la cytochrome c, et l'AIF (Apoptose Inducing Factor).

L'ouverture du PTPm est très finement régulée. Le calcium matriciel apparaît comme étant son inducteur le plus puissant, nécessaire et suffisant [78]. Les ROS agissent également directement sur l'ouverture du PTPm (Figure 10).

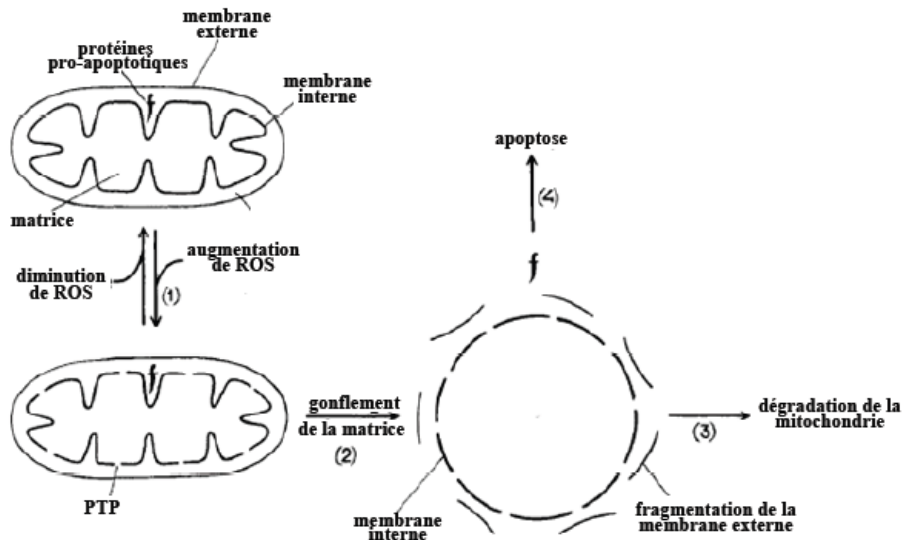


Figure 10 – Production de ROS, ouverture du PTPm et apoptose

- (1) L'augmentation de la production de ROS entraîne l'ouverture du PTPm.
  - (2) Un déséquilibre osmotique entre la matrice et l'espace intermembranaire se crée, avec gonflement de la matrice et la fragmentation de la membrane externe.
  - (3) La mitochondrie est dégradée.
  - (4) Les protéines pro-apoptotiques séquestrées dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol initiant une cascade de réactions aboutissant à l'apoptose.
- On distingue 2 grandes voies de signalisation aboutissant à la mort cellulaire :

- une voie dite extrinsèque, impliquant des récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF
- une voie dite intrinsèque, mettant particulièrement en jeu la mitochondrie, impliquant des protéines appartenant à la superfamille de Bcl-2.

Quel que soit le mode d'induction (intrinsèque ou extrinsèque), les caractéristiques morphologiques de l'apoptose sont similaires, à savoir une réduction de la taille de la cellule, une condensation de la chromatine, un clivage des chromosomes, une rupture de la membrane plasmique et une transformation des organites cellulaires en vésicules appelées corps apoptotiques.

La voie extrinsèque fait intervenir des récepteurs membranaires, notamment le récepteur Fas. La signalisation par Fas recrute un complexe composé d'une molécule adaptatrice FADD (Fas Associated Death Domain) et de la procaspase-8. La formation de ce complexe entraîne le clivage de la caspase-8 qui est alors produite sous sa forme dimérique active, puis la cascade d'activation séquentielle des différentes caspases parmi lesquelles la caspase-3. Ces différentes protéases effectuent le clivage de plusieurs molécules, parmi lesquelles des protéines de structure et des protéines impliquées dans les systèmes de réparation cellulaire. Il existe 2 voies de transduction du signal de la voie Fas, dépendant du type cellulaire. Dans les

cellules de type 1 comme les thymocytes, la caspase 8 active directement la caspase 3. Dans les cellules de type 2 comme les hépatocytes, la caspase 8 active Bid, provoquant la libération du cytochrome c, ce qui provoque alors l'activation de la caspase 3 (Figure 11).

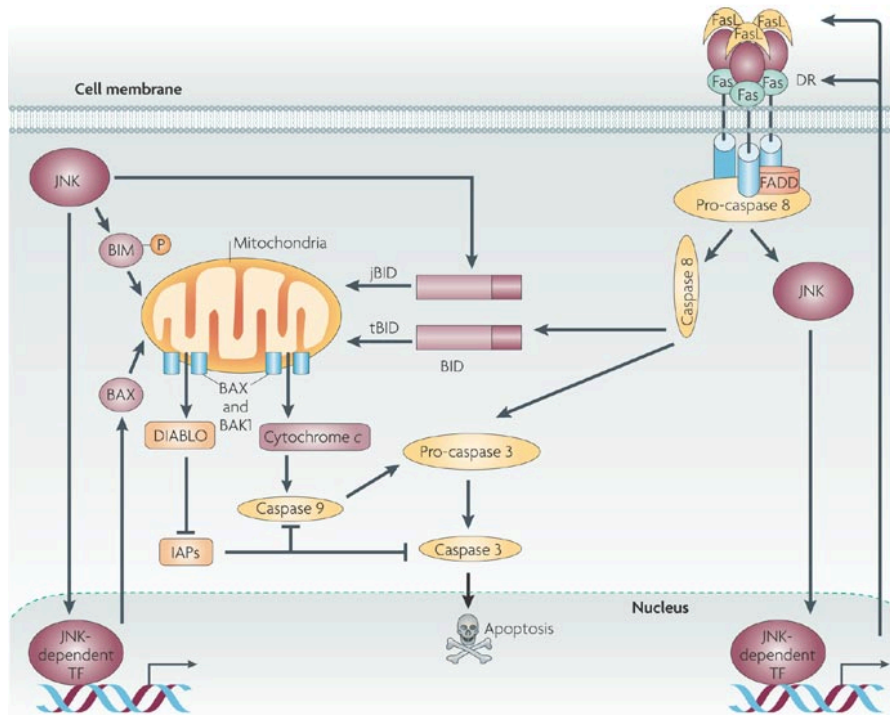


Figure 11 – Voies de l'apoptose

L'activation intrinsèque de l'apoptose conduit à l'insertion de protéines pro-apoptotiques telles que Bcl-2 associated X protein (BAX) et Bcl-2 antagonist killer (BAK1) dans la membrane des mitochondries où elles s'oligomérisent. Ces complexes multimériques provoquent la rupture des membranes mitochondriales et l'ouverture du PTPm. La conséquence est d'une part la perte du gradient électrochimique entre la membrane interne et la matrice, et la libération de protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme d'autre part. Ces protéines pro-apoptotiques libérées sont l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor), Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspase, Direct Inhibitor of Apoptosis protein Binding protein with Low pI) et le cytochrome c. Le cytochrome c ainsi libéré dans le cytoplasme clive et active la caspase 9.

#### 1.5.2.5 Mitohormesis

L'hormesis est défini comme l'activation des propriétés cellulaires protectrices et réparatrices induites par un stress physiologique modéré. Depuis quelques décennies, il était admis que l'augmentation des radicaux libres était le principal responsable du processus du vieillissement et de la diminution de la durée de vie des organismes. Durant ces années, un certain nombre d'études se sont efforcées de diminuer le stress oxydant à l'aide de molécules antioxydantes. Cependant, les résultats de ces études furent surprenants. En effet, elles ont démontré que les molécules antioxydantes avaient peu ou pas d'effets mais surtout que les ROS étaient essentiels à l'activation de voies de signalisation aboutissant à une augmentation de la durée de vie des organismes. Ces différentes études ont permis de mettre à jour un nouveau concept nommé « mitohormesis ». Ainsi, la génération de ROS mitochondriaux peut activer la biogenèse mitochondriale et la défense contre ces radicaux libres [79, 80].

#### *En résumé,*

*Le stress oxydant peut être défini comme un déséquilibre de la balance entre la production des ROS d'un côté et son élimination de l'autre. La production de ROS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie, et ne constitue pas en soi une situation de stress oxydant. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (SOD, GPX, GR, catalase), ainsi que d'autres molécules non enzymatiques apportées par l'alimentation (oligoéléments, vitamines, cytochromes). Les dommages induits par le stress oxydant correspondent à la peroxydation lipidique, l'oxydation des protéines, des mutations de l'ADN, voire l'apoptose. Toutefois, le stress oxydant peut avoir un effet bénéfique, en activant la biogenèse mitochondriale, c'est le mitohormesis.*

#### 1.5.3 Cardiomyoplastie et pulsatilité

La conception d'une circulation en série avec un tube extracardiaque ou intracardiaque n'est pas sans amener de nouvelles problématiques dans la chirurgie du cœur univentriculaire.

Depuis la fin des années 80, la cardiomyoplastie a apporté de nouvelles solutions pour les patients atteints d'insuffisance cardiaque sévère. Le principe est qu'un muscle squelettique (en l'occurrence le grand dorsal) électrostimulé devient à long terme résistant à la fatigue. Cela est rendu possible par une transformation de ses caractéristiques métaboliques et électrophysiologiques, après avoir établi des protocoles de pré-conditionnement musculaire ayant pour but d'augmenter le nombre de fibres lentes et d'orienter son métabolisme énergétique vers un profil oxydatif [81]. De plus, la force de contraction est conservée et le muscle est donc capable de fournir un travail comparable à celui du myocarde [81-83].

#### 1.5.3.1 Technique chirurgicale

Lors de la cardiomyoplastie, la technique utilisée consiste à disséquer la totalité du muscle grand dorsal (MGD), le pédicule vasculonerveux devant impérativement être préservé. Deux électrodes de stimulation intramusculaires sont implantées au niveau de la division du nerf du grand dorsal, afin de réaliser une électrostimulation bipolaire spécifique. Le MGD est ensuite passé à travers une fenêtrée réalisée dans le "gril costal", pour être placé à l'intérieur du thorax. Dans le cadre d'une intervention de Fontan, le muscle est placé sur l'oreillette. Puis, deux électrodes sont implantées dans la paroi ventriculaire [83]. Les électrodes sont ensuite reliées à un cardiomyostimulateur. La stimulation du muscle commence seulement deux semaines après l'intervention, pour laisser le temps au muscle de cicatriser, afin de permettre le développement d'une circulation collatérale, et également qu'une formation d'adhérences entre le cœur, le muscle, et le péricarde puisse se faire. La stimulation du muscle commence par des impulsions uniques, puis au bout de deux semaines, par des trains d'impulsions à 30 Hz. Le MGD est électrostimulé pendant la systole ventriculaire [83, 84].

Le but d'une cardiomyoplastie sur l'oreillette droite est de restaurer une fonction ventriculaire droite, après avoir réalisé une dérivation atrio-pulmonaire, et ainsi d'augmenter le débit cardiaque des patients ayant subi cette intervention, suite à une chirurgie de Fontan.

#### 1.5.3.2 Approches nouvelles

Depuis ces travaux préliminaires que ce soit dans le cadre d'une cardiomyoplastie ventriculaire ou auriculaire, il a été observé que des stimulations continues étaient délétères pour le MGD. Chez le mouton, une stimulation continue de 24 heures causait une atrophie des fibres de plus de 40% et une perte importante de la fonction contractile, alors qu'une stimulation limitée à 10 heures par jour engendrait seulement de minimes atrophies des fibres, avec tout de même une infiltration graisseuse et une fibrose [85]. Chez des chèvres, Ianuzzo et



al. [86] ont observé également qu'une stimulation limitée à 12h par jour préservait l'architecture musculaire avec une plus faible dégénération musculaire, une surface de fibres plus large et une diminution de la densité de tissu conjonctif. Chez des chiens, Kashem et al. [87] ont démontré que des stimulations intermittentes lors du protocole de conditionnement, permettaient une forte augmentation de la pression et du volume d'éjection systolique.

L'ensemble de ces travaux ouvre en perspective, la création d'un tube extracardiaque contractile capable de générer un flux pulsatile dynamique. Outre les difficultés de pré-conditionnement du muscle grand dorsal, visant à un remodelage positif vers un métabolisme oxydatif, il nous incombe de savoir si les capacités anatomiques et morphologiques du muscle grand dorsal, permettent d'envisager de suppléer la fonction myocardique, en dynamisant un tube extracardiaque. Nous savons que les propriétés métaboliques, et donc son rendement énergétique, ne lui permettent pas d'assurer cette fonction au long terme. Il s'agit d'un muscle squelettique mixte oxydatif et glycolytique. Néanmoins, cette problématique n'est pas insurmontable, comme l'a démontré Carraro et al. [88], les protocoles de pré-conditionnement par stimulation électrique orientent les fibres de ce muscle strié vers un profil oxydatif, moins fatigable et à plus haut rendement énergétique. Il restera à définir les protocoles de stimulation pour que les efforts mécaniques répétitifs ne soient pas apparentés à des phénomènes d'ischémie reperfusion, conduisant à une ischémie, fibrose et nécrose [89]. Un protocole de pré-conditionnement adapté par stimulation électrique [88], permettra d'augmenter son rendement énergétique en lui conférant un profil oxydatif. Il restera à comprendre comment potentialiser cet effet pour qu'il perdure à long terme. Notre approche sur la physiologie du métabolisme énergétique dans le myocarde nous servira d'élément de référence, pour appréhender au mieux le profil énergétique du muscle squelettique le plus approprié pour réaliser ce type de travail. Notre objectif à plus long terme sera de définir le protocole de pré-conditionnement du muscle grand dorsal, garantissant un remodelage énergétique proche de celui du cœur.

A ce stade le véritable problème est tout d'abord, de s'assurer de la faisabilité anatomique à dynamiser mécaniquement un tube extracardiaque par un muscle grand dorsal pédiculé. Ensuite, de s'assurer qu'un tube extracardiaque, tel que celui utilisé dans une totalisation de Fontan, puisse d'une part générer un débit suffisant, et d'autre part d'avoir une compliance nécessaire et suffisante, ou relâchement de ce tube, sans altération rhéologique.

Pour être finaliste, si l'on considère la dysfonction d'une circulation de Fontan inéluctable à long terme, résultat d'une altération de la fonction myocardique d'un ventricule unique, que nous faisons un parallèle avec la dysfonction d'un muscle squelettique sensé suppléer partiellement le travail d'un cœur, la compréhension du métabolisme énergétique musculaire visant à son optimisation est donc opportune.

## Deuxième partie

### Travaux de recherche : Problématique et Hypothèse

## 2 Problématique et hypothèse

### 2.1 Analyse rétrospective

L'objectif de ce travail a été de déterminer s'il pouvait exister une alternative à la circulation de Fontan, en assurant une circulation mixte entre un débit pulmonaire pulsé issu du ventricule unique, couplé à une dérivation cavopulmonaire partielle. Nous avons donc réalisé une étude clinique rétrospective évaluant les résultats à long terme de 70 patients porteurs d'un cœur univentriculaire et palliés par une dérivation cavo-pulmonaire partielle (DCPP) associé à un flux pulmonaire additionnel, entre 1990 et 2000. Notre étude observationnelle nous a permis de conclure : (i) que cette stratégie ne permettait pas d'assurer une palliation définitive, (ii) que toutefois elle permettait d'obtenir un taux de survie élevé, (iii) qu'elle n'excluait pas la réalisation avec succès d'une circulation de Fontan, (iv) enfin que cette stratégie pouvait retarder à long terme la survenue des effets délétères d'une circulation de Fontan.

L'étude citée a été publiée dans « European Journal of Cardio-Thoracic Surgery ». Ci-après une version de l'article est donnée.

Cette étude clinique nous a alors conforté dans le choix de la thématique de nos travaux expérimentaux. Comment optimiser une circulation de Fontan ?

L'approche a consisté à diminuer la morbi-mortalité inhérente aux différentes procédures chirurgicales dans la prise en charge des cœurs univentriculaires d'une part, et d'autre part, essayer de concevoir une optimisation de la circulation de Fontan.

Notre première approche expérimentale permet de répondre à ces deux prérequis, alliant le côté chirurgie hybride et mini-invasive, supposée au moins diminuer la morbidité des patients, mais également de pouvoir réaliser une circulation de Fontan au moment le plus opportun dans la vie de l'enfant ou du jeune adulte afin de minimiser les complications à long terme d'une telle circulation.

La seconde approche est plus ambitieuse, elle est énergétique. Nous étudions le métabolisme énergétique du muscle cardiaque. L'objectif étant d'augmenter le rendement énergétique musculaire afin qu'il s'adapte à sa fonction. Pour suppléer le ventricule unique

dans sa fonction, deux possibilités existent, l'une basée sur la médecine régénératrice cherchant à augmenter le rendement énergétique du cœur lui-même, et l'autre en suppléant partiellement sa fonction en créant un tube pulsatile. L'approche est énergétique, cherchant à comprendre et optimiser le métabolisme énergétique d'un muscle cardiaque ou squelettique.

## Bidirectional cavopulmonary shunt with additional pulmonary blood flow: a failed or successful strategy?<sup>†</sup>

Sébastien Gérelli<sup>a</sup>, Célia Boulitrop<sup>a</sup>, Mathieu Van Steenberghe<sup>a</sup>, Davide Maldonado<sup>a</sup>, Mirela Bojan<sup>a</sup>,  
Olivier Raisky<sup>a</sup>, Daniel Sidi<sup>b</sup> and Pascal R. Vouhé<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pediatric Cardiac Surgery, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité and Sick Children Hospital, Paris, France

<sup>b</sup> Department of Pediatric Cardiology, University Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité and Sick Children Hospital, Paris, France

\* Corresponding author. Chirurgie Cardiaque Pédiatrique, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149 rue de Sévres, 75015 Paris, France. Tel: +33-1-44381867; fax: +33-1-44381911; e-mail: pascal.vouhe@nck.aphp.fr (P. Vouhé).

Received 4 September 2011; received in revised form 23 November 2011; accepted 27 November 2011

### Abstract

**OBJECTIVES:** In patients with single ventricle physiology, Fontan circulation is considered as the optimal surgical approach, although it entails a growing incidence of late complications. It has been speculated that the association of bidirectional cavopulmonary shunt (BCPS) and additional pulmonary blood flow (APBF) might provide long-lasting palliation. The present study was undertaken to assess the long-term outcome of this strategy.

**METHODS:** A group of 70 patients with single ventricle physiology, who underwent BCPS with APBF between 1990 and 2000, were reviewed retrospectively. Median age at operation was 2 years (range: 0.1–27 years). Unilateral BCPS was performed in 60 patients (86%), bilateral BCPS in 9 and the Kawashima procedure in 1. APBF was provided through antegrade pulmonary outflow tract in 43 patients (61%) and by aortopulmonary shunt in 27 (39%). Two patients died early and three were lost to follow-up. Mean follow-up of the 65 remaining patients was 13.5 ± 4 years. End-points were death, need for heart transplantation (HTx) or Fontan completion and functional outcome.

**RESULTS:** Five patients died (two after HTx, three from ventricular failure); overall actuarial survival was 89 ± 4% at 15 years. Six patients underwent HTx (one after Fontan completion) with two early deaths and no late mortality. Fifty-one patients underwent Fontan completion (11 with additional palliative procedures before completion); there was no early or late mortality following Fontan completion; one patient underwent HTx. Among the remaining six patients with BCPS and APBF, two were not suitable for Fontan completion and four remained suitable. Overall, clinical failure (mortality, HTx, unsuitability for Fontan completion) occurred in 13 patients (19%). Risk factors for clinical failure were older age at BCPS ( $P = 0.01$ ) and postoperative complications after BCPS ( $P = 0.001$ ). Considering late mortality, HTx and Fontan completion as strategic failures, the actuarial freedom from these events was 20 ± 5% at 10 years.

**CONCLUSIONS:** BCPS with APBF approach: (i) fails as a strategy for definitive palliation, (ii) provides a high survival rate, (iii) does not preclude a successful Fontan completion and (iv) may delay the long-term deleterious consequences of Fontan circulation. Palliation by BCPS with APBF should be achieved early in life.

**Keywords:** Single ventricle • Surgical management • Palliative surgery • Fontan procedure

### INTRODUCTION

Patients born with single ventricle physiology have a poor natural prognosis. Introduced in the early 1970s, the Fontan procedure and its modifications have changed this unsatisfactory outcome. However, the Fontan circulation carries in itself the substrates for late dysfunction of the pulmonary arterial and systemic venous circulations [1]. The very late results of Fontan circulation may be disappointing [2]. On the other hand, it is well established that patients who are fortunate enough to have a good balance between the systemic and pulmonary blood flows (spontaneously or after palliative surgery) may have a long-lasting satisfactory

outcome [3]. From a theoretical point of view, a bidirectional cavopulmonary shunt (BCPS) associated with a well-calibrated source of additional pulmonary blood flow (APBF) should yield such a favourable haemodynamic status. We proposed, in the late 1980s, the hypothesis that BCPS with APBF may provide a long-lasting, and potentially, definitive palliation. The early results of this approach have been reported [4], but the late outcome remains to be determined.

### MATERIALS AND METHODS

#### Study design

Since the early 1990s, most patients with single ventricle physiology have been palliated by the association of a BCPS and one

<sup>†</sup>Presented at the 23th Annual Meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery, Lisbon, Portugal, 1–3 October 2011.

**Table 1:** Patient characteristics

	No. of patients	%
<b>Anatomic diagnosis</b>		
Tricuspid atresia	26	37
Mitral atresia	12	17
Double inlet ventricle	14	20
Double outlet right ventricle	6	9
Heterotaxy syndrome	5	7
Unbalanced AV canal	3	4
Pulmonary atresia/intact septum	1	2
Other complex anomalies	3	4
<b>Systemic ventricle</b>		
Morphologic left ventricle	36	51
Morphologic right ventricle	22	31
Biventricular	11	16
Unknown	1	2
<b>Other morphological data</b>		
Atrial isomerism	11	16
Anomalous systemic venous return	12	17
Anomalous pulmonary venous return	8	11
Anomalies situs/position	17	24

(or several) additional sources of pulmonary blood flow. The present study was undertaken to evaluate the late results of this approach in a well-selected group of patients. Permission to perform a health records review was obtained from the Paris V University Ethics Committee. The need for individual consent was waived.

### Study population

A group of 70 patients was selected, including all the patients who met three inclusion criteria: (i) uniform medical management; all patients were considered, at the time of BCPS as good candidates for Fontan circulation; nevertheless, they were managed by the same attending team (D.S. as cardiologist and P. R.V. as surgeon) with the intention of avoiding Fontan completion as much as possible, (ii) palliation by BCPS with APBF between 1990 and 2000 and (iii) living in France.

The anatomic characteristics of the patients are reported in Table 1. Forty-one patients (59%) were male. Most patients (77%) had one palliative procedure or more before BCPS; these procedures are reported in Table 2.

### Surgical management

Median age at BCPS was 2 years (range: 0.1–27 years); 35 patients (50%) were <2 years, 14 (20%) were between 2 and 5 years of age and 21 (30%) were 5 years or older. Unilateral BCPS was performed in 60 patients (right in 58, left in 2). Nine children had bilateral BCPS and one patient [with interrupted inferior vena cava (IVC)] had a Kawashima procedure.

APBF was antegrade through the native pulmonary outflow tract (stenosed or banded) in 43 patients (61%) or retrograde via aortopulmonary shunts in 27 (39%). Associated procedures (listed in Table 3) were performed in 35 patients (50%).

**Table 2:** Surgical procedures before BCPS with APBF

	No. of procedures
<b>Initial palliation</b>	
Aortopulmonary shunt	41
Pulmonary banding	13
Associated procedures	12
Palliative arterial switch	2
TAPVD repair	1
Atrial septectomy	7
Enlargement of bulboventricular foramen	1
Aortic obstruction relief	2
<b>Interimpalliation (before BCPS)</b>	
Aortopulmonary shunt	16
Ventricle to PA conduit	1

TAPVD: total anomalous pulmonary venous drainage; PA: pulmonary artery.

**Table 3:** Associated procedures (at the time of BCPS with APBF)

	No. of procedures
Pulmonary artery angioplasty	17
Aortopulmonary shunt	4
Pulmonary banding	4
Atrial septectomy	5
APVD repair	2
Closure of AV valve	1
Pacemaker implantation	1
Aortic obstruction relief	2

APVD: anomalous pulmonary venous drainage.

### Follow-up and data analysis

Follow-up data were obtained during a 3-month closing interval (April 2011 to June 2011). Information was obtained for 67 patients (96% complete).

Primary end-points included survival, need for heart transplantation (HTx), need for Fontan completion and suitability for Fontan completion. Functional outcome, including evolution of ventricular function, was evaluated as well.

Continuous data were tested for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Data were described as frequencies, medians with ranges and means with standard deviations, as appropriate. Comparisons were performed using the  $\chi^2$  or Fisher's exact tests for categorical variables, and the Mann-Whitney U-test for continuous variables. Estimates of time-related survival and freedom from adverse events were calculated using the Kaplan-Meier method. All analyses were performed using SPSS for Windows version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The relationship between age at BCPS and the probability of clinical failure (death, HTx or unsuitability for Fontan completion) was evaluated using a Loess smoother (performed with the 'Design' software in the R statistical package—[www.r-project.org](http://www.r-project.org)). This is a non-parametric regression estimate of the relationship between

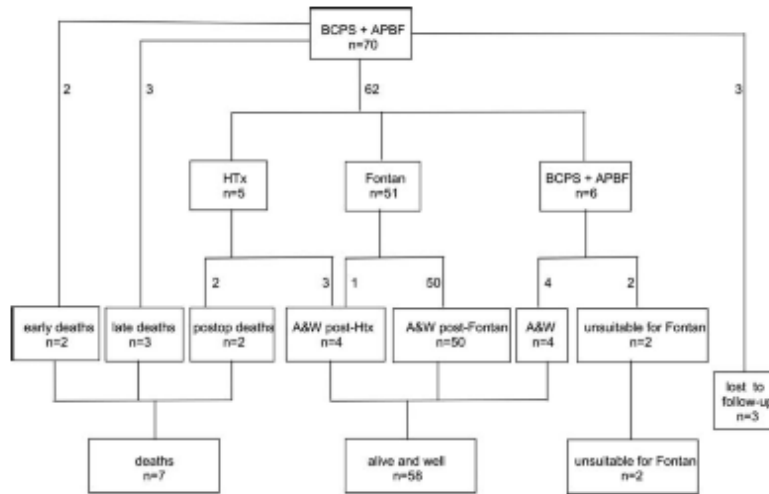


Figure 1: Overview of the study population. BCPS + APBF: bidirectional cavopulmonary shunt with additional pulmonary blood flow; HTx: heart transplantation; A&W: alive and well.

the two variables, using locally weighted polynomial regression. It allows estimation of the curve of the probability of bad outcome during follow-up as a function of age at BCPS. Patients lost to follow-up were not included in the analysis.

## RESULTS

Figure 1 provides an overview of the patient population. Overall, 7 patients (10%) died (two early, three late and two after HTx), 3 patients (4.2%) were lost to follow-up, 2 patients (2.8%) with BCPS and APBF were unsuitable for Fontan completion and 58 patients (83%) were alive and well (50 after Fontan completion, 4 after HTx, 4 with BCPS and APBF).

### Early results

Two patients (2.8%) died early after BCPS with APBF. A 1-month old infant died of severe cyanosis because of acute thrombosis of the cavopulmonary anastomosis. The other death (in a 6-month old child) was due to mediastinitis.

Median duration of mechanical ventilation was 12 h (range: 4–288 h) and median intensive care unit length of stay was 3 days (range: 1–30 days). Postoperative complications occurred in 17 patients (24%) and included: superior vena cava (SVC) syndrome (5), chylothorax (4), prolonged pleural effusions (2) and miscellaneous (6).

### Late results

Three patients were lost to follow-up. Mean follow-up of the 65 remaining patients was  $13.5 \pm 4$  years (range: 1–20 years). Mean age of the patients at last follow-up was  $18 \pm 6$  years.

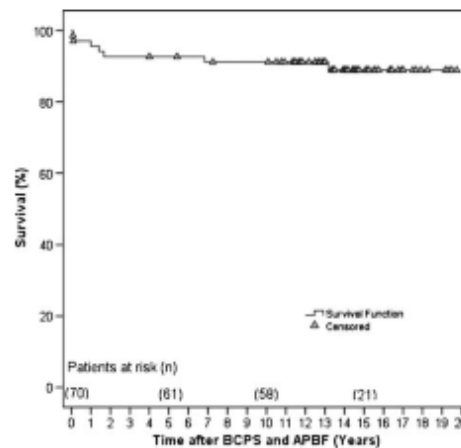


Figure 2: Actuarial survival after BCPS with APBF (including early mortality).

**Late mortality.** Five patients died during follow-up. Median age at death was 19 years (range: 2–28 years) and median time between BCPS and death was 4 years (range: 1–13 years). Two patients died early after HTx and three patients died from ventricular failure while on the transplant waiting list. The actuarial survival rate for the overall population was  $89 \pm 4\%$  at 15 years (Fig. 2).

Incremental risk factors for late mortality were: age at BCPS with APBF ( $P = 0.05$ ) (median age at BCPS for the five patients who died was 12 years—range: 0.3–27 years), low shortening fraction of the single ventricle ( $P = 0.007$ ) and postoperative complications after BCPS ( $P = 0.002$ ).



**Heart transplantation.** Five patients underwent HTx after BCPS with two early deaths and no late mortality. Median age at transplantation was 19 years (range: 2–28 years) and median time between BCPS and transplantation was 5 years (range: 2–13 years). Incremental risk factors for HTx were age at BCPS ( $P = 0.07$ ) and postoperative complications after BCPS ( $P = 0.002$ ).

An additional patient underwent successful transplantation for ventricular failure after Fontan completion.

**Fontan completion.** Fifty-one patients underwent Fontan completion because of worsening cyanosis and/or decreasing exercise capacity. Median age at Fontan completion was 9 years (range: 2–23 years) and median time between BCPS and Fontan completion was 7 years (range: 1–16 years).

In 40 patients, Fontan completion was performed as the first subsequent step after BCPS with APBF. In the 11 other patients, additional interventions were performed during the interim period between BCPS and Fontan completion and included: additional aortopulmonary shunt (5), aortopulmonary shunt with enlargement of the bulboventricular foramen (1), surgical pulmonary artery angioplasty (1), percutaneous pulmonary angioplasty (2), common atrioventricular (AV) valve repair (1) and mitral valve replacement (1).

Fontan completion was carried out using an extracardiac conduit in 47 patients (92%) and an intracardiac lateral tunnel in 4. Fenestration was performed in 46 cases (90%). Associated procedures were required in four patients (pulmonary angioplasty in three, AV valve replacement in one).

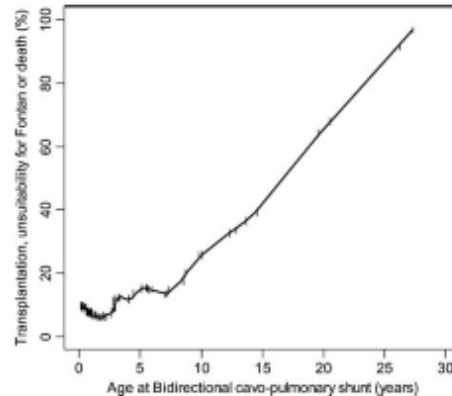
There was no early or late mortality following Fontan completion. One patient underwent successful HTx 2.5 years after Fontan completion because of severe AV valve regurgitation and ventricular failure. Median follow-up after Fontan completion for the remaining 50 patients was 7 years (range: 0.4–19 years). At last follow-up, 46 patients (92%) were in NYHA functional class I/II; median oxygen saturation at rest was 95% (range: 84–99%); dysfunction of the single ventricle (shortening fraction <25%) was noted in 6 patients (12%) and more than trivial regurgitation of the AV valve in 7 (14%).

Deterioration of ventricular function occurred in seven patients following Fontan completion (one had HTx). Incremental risk factors for ventricular dysfunction after Fontan completion were older age at BCPS ( $P = 0.02$ ) and the presence of antegrade pulmonary blood flow in addition to BCPS ( $P = 0.03$ ).

**Patients surviving with BCPS and APBF.** At last follow-up, six patients (9%) were surviving with BCPS and APBF with a median age of 20 years (range: 13–33 years).

Among these six patients, four had a satisfactory clinical palliation (in two of them, an additional aortopulmonary shunt had been performed during the interim period). These patients were considered as adequate candidates for Fontan completion if indicated.

The last two patients were deemed unsuitable for Fontan completion despite progressive clinical deterioration, because of stable ventricular dysfunction with AV valve regurgitation in one, and pulmonary artery hypoplasia and increased pulmonary pressure in the second. These two patients, 33 and 19 years old, were in functional class II, with a mean oxygen saturation at rest of 85%. One was leading an active, although limited, professional life; the other had severe psychiatric disorders.



**Figure 3:** Assessment of the relationship between age at BCPS with APBF and probability of clinical failure (death, HTx, unsuitability for Fontan) using a loess smoother estimate. Tick marks show the distribution of all patients.

Considering mortality (early and late), HTx and unsuitability for Fontan completion as clinical failures, 13 patients (19%) failed. Incremental risk factors for clinical failure included age at BCPS ( $P = 0.01$ ) and postoperative complications after BCPS ( $P = 0.001$ ). The relationship between age at BCPS and the probability of clinical failure is illustrated in Fig. 3.

Considering late mortality, HTx and Fontan completion as strategic failures of the surgical approach, the actuarial freedom from these events was  $71 \pm 6\%$  at 5 years and  $20 \pm 5\%$  at 10 years (Fig. 4).

## DISCUSSION

In patients with single ventricle physiology, the surgical protocol adopted in most centres follows a staging approach and includes BCPS and later Fontan completion. Even if widely accepted, this protocol is still a matter for discussion and many points remain controversial.

BCPS has beneficial effects on both the systemic arterial oxygen saturation (by increasing effective pulmonary blood flow) and the ventricular function (by volume unloading the ventricle) [5]. It is commonly advocated to perform BCPS early in life, in order to provide optimal preservation of ventricular function [6].

The potential usefulness or harmfulness of leaving, in association with BCPS, other sources of APBF has been the subject of many discussions. Controversial data have been reported regarding mortality and morbidity, ventricular loading and function, systemic venous pressure and SVC syndrome, pulmonary artery pressure, growth of the pulmonary arteries, development of pulmonary arteriovenous malformations or systemic venous collaterals and suitability for Fontan completion [7–11]. From this information, and even if it is sometimes contradictory, it can be assumed that BCPS with an 'appropriate' APBF provides adequate oxygen saturation and does not impair ventricular or AV valve functions. BCPS with APBF may yield long-lasting adequate palliation and may even be considered as a potential definitive palliation, particularly in high-risk Fontan patients

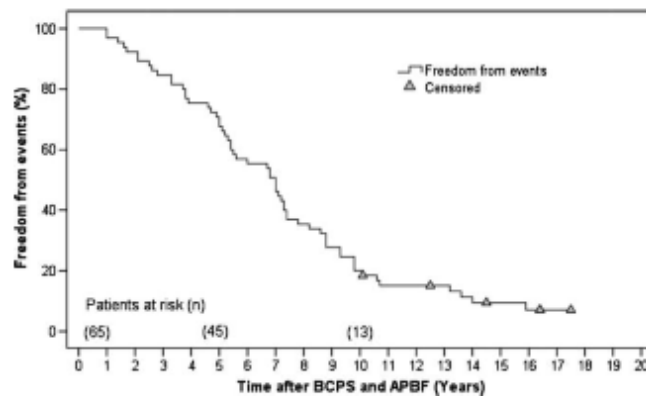


Figure 4: Actuarial freedom from events defining strategic failure (late mortality, HTx, Fontan completion).

[12, 13]. On a theoretical background, it is possible to reach a satisfactory level of arterial oxygen without excessive loading of the ventricle, by adding to the BCPS an 'appropriate' amount of pulmonary blood flow [14]. Although difficult to define, an 'appropriate' APBF is probably reached when the pulmonary to systemic blood flow ratio is close to 1. Excessive pulmonary blood flow, which may overload the ventricle and damage the pulmonary vascular bed, must be avoided. One of the main practical difficulties of this approach is to maintain an 'appropriate' level of APBF as the child grows.

The Fontan procedure (particularly its last modification using an extracardiac conduit) can be carried out with a low early risk and yields satisfactory mid-term results. However, there is growing evidence that the very late results of Fontan circulation may be disappointing. By definition, in a Fontan circulation, the pressure is equivalent in the systemic venous system and in the pulmonary arterial bed whereas, in a normal biventricular circulation, the mean systemic venous pressure is <10 mmHg and the mean pulmonary arterial pressure at least 15 mmHg to keep the pulmonary vasculature patent. Therefore, Fontan circulation imposes caval hypertension (particularly in the IVC system), as well as relative pulmonary arterial hypotension (in addition to the absence of pulsatility) [1]. This so-called 'Fontan paradox' explains the modes of late failure of Fontan circulation: protein-losing enteropathy, plastic bronchitis, hepatic and renal failure, progressive thrombo-embolic deterioration of the pulmonary vascular bed, chronic underloading of the systemic ventricle with chronic low output state [2]. For all these reasons, it may be reasonable to avoid Fontan circulation or, at least, to delay Fontan construction as much as possible.

With all these considerations in mind, we decided, in the early 1990s, to keep the single ventricle patients with BCPS and APBF as long as possible. This approach was assumed to provide adequate oxygen saturation without excessive ventricular volume loading, solve the Fontan paradox by maintaining a low pressure in the IVC system and improve pulmonary perfusion by providing some pulsatility. Fontan completion was not planned systematically, but performed only when clinical deterioration occurs. The present study reports the long-term results of this strategy.

### As a strategy for definitive palliation, BCPS with APBF is a failure

Considering that BCPS with APBF failed as a strategy when the patient died, underwent HTx because of ventricular failure or underwent Fontan completion because of clinical deterioration, the probability of freedom from failure was 71% at 5 years and only 20% at 10 years. At last follow-up, only four patients (6%) were doing well with BCPS and APBF. Most patients had to undergo Fontan completion because of inadequate pulmonary blood flow. Increasing cyanosis may be due to several factors, including decreasing SVC to IVC blood flow ratio with age, development of pulmonary arteriovenous malformations or systemic venous collaterals, and surgical inability to maintain 'appropriate' APBF. In some patients, we tried to maintain a satisfactory status by adding a new or bigger aortopulmonary shunt. This nearly always failed with time. Therefore, when the clinical situation is deteriorating (worsening cyanosis, decreasing functional capacity), Fontan completion should be performed as a first option, if allowed by ventricular and pulmonary vascular status.

### As a clinical approach, BCPS with APBF may be a successful option

Actuarial survival was 89% at 15 years after BCPS with APBF. This confirms the results noted in other series in which patients were systematically entered in a staging to Fontan policy [15-17]. In Tanoue's report, among 333 patients who had BCPS, actuarial survival was 90% at 10 years [15]. In the Melbourne experience which includes 212 patients with BCPS, survival was 89% at 15 years [16]. In these two series, the Fontan completion rate was 69 and 66%, respectively, whereas it was 73% in our experience. Although the information is scarce, these data suggest that adding some pulmonary blood flow to BCPS may not impair survival and the rate of suitability for Fontan [12, 13].

Considering death, HTx and unsuitability for Fontan as clinical failures, there was a 19% failure rate. Nearly all failures were related to progressive deterioration in ventricular function,



usually associated with AV valve regurgitation (only one patient could not undergo Fontan completion because of anatomic factors). The question then arises to know whether excessive pulmonary blood flow (due to APBF) with ventricular volume overloading may, in part, explain this incidence of ventricular dysfunction. There are some preliminary answers to this question. On one hand, ventricular failure may occur in single ventricle patients, whatever the surgical approach is [18]. This is one of the most frequent modes of late failure, even after the Fontan procedure in which optimal volume unloading is provided [2]. On the other hand, and even if the results should be taken with caution because of the small number of patients, older age at the time of BCPS with APBF was associated with an increased risk of adverse events (including postoperative complications, late mortality, need for transplantation and ventricular dysfunction after Fontan completion). These data strongly suggest that BCPS should be performed early in life in order to provide early volume unloading [6]. However, there is also some evidence to support that BCPS should not be achieved too early (before 3 months of age) [19].

Median time between BCPS and Fontan completion was 7 years. Results following Fontan completion were satisfactory (no mortality and no major complication after a median follow-up of 7 years). This suggests that delaying Fontan completion as long as possible may not impair the results of this procedure. This conclusion is supported by other recent reports [20]. It is usually accepted that the Fontan circulation *per se* creates a situation with potential deleterious consequences. Delaying Fontan completion just mechanically delays the establishment of a potentially dangerous situation. However, there is no evidence to suggest that delaying Fontan completion may influence the incidence, delay of onset or severity of Fontan complications.

### Study limitations

The retrospective nature of the study is a limitation. The study population was deliberately limited to a selected group of patients (i) living in France (to limit the number of patients who are lost to follow-up), (ii) operated upon before 2000 (to obtain a minimal follow-up of 10 years) and (iii) treated by the same attending medico-surgical team with the firm intention of delaying Fontan completion as far as possible, despite the fact that the patients were, at the time of BCPS, good candidates for a Fontan pathway. This resulted in the inclusion of ~40% of patients having BCPS in our institution during the study period. The study group is therefore small and the adverse events rare; statistical results must be interpreted with caution and potential bias may have been introduced. Although this issue is out of the scope of the present study, the analysis of the results in the patients who were excluded, could provide valuable information.

### CONCLUSIONS

BCPS with APBF provides a satisfactory palliation in the mid-term, but not in the long run; it cannot serve, except in very rare cases, as a definitive palliation. This approach does not impair the suitability for Fontan completion and the early and late results of the Fontan procedure. The clinical need for Fontan completion is delayed (by a median time of 7 years) and the potential deleterious consequences of Fontan circulation are

therefore postponed. Early BCPS with its related ventricular volume unloading may improve the results regarding ventricular function.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We express our appreciation to Corinne Pasquet for secretarial assistance.

Conflict of interest: none declared.

### REFERENCES

- [1] de Leval MR. The Fontan circulation: a challenge to William Harvey? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005;2:202-8.
- [2] Khairy P, Fernandes SM, Mayer JE, Triedman JK, Walsh EP, Lock JE et al. Long-term survival, modes of death, and predictors of mortality in patients with Fontan surgery. *Circulation* 2008;117:85-92.
- [3] Franklin RC, Spiegelhalter DJ, Anderson RH, Macartney FJ, Rossi Filho RI, Douglas JM et al. Double-inlet ventricle presenting in infancy. I. Survival without definitive repair. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;101:767-76.
- [4] van de Wal HJCM, Ouaknine R, Tamisier D, Lévy M, Vouhé PR, Leca F. Bi-directional cavopulmonary shunt: is accessory pulmonary flow, good or bad? *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:104-10.
- [5] Freedom RM, Nykanen D, Benson LN. The physiology of the bidirectional cavopulmonary connection. *Ann Thorac Surg* 1998;66:664-7.
- [6] Cleuziou J, Schreiber C, Cornelsen JK, Hörer J, Eicken A, Lange R. Bidirectional cavopulmonary connection without additional pulmonary blood flow in patients below the age of 6 months. *Eur J Cardiothorac Surg* 2008;34:556-62.
- [7] Miyaj K, Shimada M, Sekiguchi A, Ishizawa A, Isoda T. Usefulness of pulsatile bidirectional cavopulmonary shunt in high-risk Fontan patients. *Ann Thorac Surg* 1996;61:845-50.
- [8] Yamada K, Roques X, Éla N, Laborde MN, Jimenez M, Choussat A et al. The short- and mid-term results of bidirectional cavopulmonary shunt with additional source of pulmonary blood flow as definitive palliation for the functional single ventricular heart. *Eur J Cardiothorac Surg* 2000;18:683-9.
- [9] Yoshida M, Yamaguchi M, Yoshimura N, Murakami H, Matsuhsita H, Okita Y. Appropriate additional pulmonary blood flow at the bidirectional Glenn procedure is useful for completion of total cavopulmonary connection. *Ann Thorac Surg* 2005;80:976-81.
- [10] Gray RG, Altmann K, Mosca RS, Prakash A, Williams IA, Quaegebeur JM et al. Persistent antegrade pulmonary blood flow post-Glenn does not alter post-Fontan outcomes in single-ventricle patients. *Ann Thorac Surg* 2007;84:888-93.
- [11] Calvaruso DF, Rubino A, Ocello S, Salvato N, Guardi D, Petrucci DF et al. Bidirectional Glenn and antegrade pulmonary blood flow: temporary or definitive palliation? *Ann Thorac Surg* 2008;85:1389-96.
- [12] Yeh T, Williams WG, McCrindle BW, Benson LN, Coles JG, Van Ansdell GS et al. Equivalent survival following cavopulmonary shunt: with or without the Fontan procedure. *Eur J Cardiothorac Surg* 1999;16:111-6.
- [13] Day RW, Etheridge SP, Veasy G, Jenson CB, Hillman ND, Di Russo GB et al. Single ventricle palliation: greater risk of complications with the Fontan procedure than with the bidirectional Glenn procedure alone. *Int J Cardiol* 2006;106:201-10.
- [14] Sidi D. The partial cavo-pulmonary circulation with an additional source of pulmonary flow. An alternative to the total cavo-pulmonary circulation in patients with a functionally single ventricle. *Cardiol Young* 2004;14(Suppl 3):62-3.
- [15] Tanoue Y, Kado H, Boku N, Tatewaki H, Nakano T, Fukae K et al. Three hundred and thirty-three experiences with the bidirectional Glenn procedure in a single institute. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2007;6:97-101.
- [16] Tan AM, Iyengar AJ, Donath S, Bullock AM, Wheaton G, Grigg L et al. Fontan completion rate and outcomes after bidirectional cavopulmonary shunt. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;38:59-65.
- [17] Scheurer MA, Hill EG, Vasuki N, Maurer S, Graham EM, Bandisole V et al. Survival after bidirectional cavopulmonary anastomosis: analysis of preoperative risk factors. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2007;134:82-9.

- [18] Gatzoulis MA, Munk MD, Williams WG, Webb GD. Definitive palliation with cavopulmonary or aortopulmonary shunts for adults with single ventricle physiology. *Heart* 2000;83:51-7.
- [19] Friedman KG, Salvin JW, Wypij D, Gurmu Y, Bacha EA, Brown DW et al. Risk factors for failed staged palliation after bidirectional Glenn in infants who have undergone stage one palliation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011; 40:1000-6.
- [20] Pace Napoleone C, Oppido G, Angeli E, Giardini A, Resciniti E, Gargiulo G. Results of the modified Fontan procedure are not related to age at operation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010;37:645-50.

## APPENDIX. CONFERENCE DISCUSSION

**Dr F. Hanley** (Stanford, CA, USA): I have a couple of questions. This cohort of 70 patients that received the Glenn and the extra source of flow during that time period, was that all of your patients, or a selected group? Were there other patients who only got a bidirectional Glenn during that time period?

**Dr Gerelli:** This is a selected group by Professor Sidi and Professor Vouhé.

**Dr Hanley:** So how were they selected would be the next question?

**Dr P. Vouhé** (Paris, France): This is obviously one of the weaknesses of this study. This is a very selected group: 1) operated before 2000 to get a long follow-up, 2) operated upon by myself, and 3) living in France. This represents only 30 to 40% of the patients who underwent BCPS during this period.

**Dr Hanley:** So the next important question is why did you put an extra source in some patients and not in others, because that is very important if we try to generalize these conclusions, because we now have a very selected group of patients.

**Dr Vouhé:** This was actually in the hope of getting definitive palliation. This was a selected group of patients with good ventricular function who were supposed to become good candidates for a Fontan. The idea was to delay as much as possible the need for Fontan and, hopefully, to avoid Fontan completely. This, obviously, was not the case.

**Dr Hanley:** So if you were faced with a patient back in that decade and you were going in to do the Glenn, you decided to put an extra source of pulmonary blood flow in the most favourable subgroup, is that what you are saying?

**Dr Vouhé:** Yes. We still do it the same way.

**Dr Hanley:** And in the other ones that were less favourable, you did an isolated Glenn with no extra source of pulmonary blood flow?

**Dr Vouhé:** Exactly.

**Dr Hanley:** So that is interesting in and of itself. I guess my next question relates to if the goal here was to go as far as you could without a Fontan, it is inevitable that if you do a Glenn and a shunt, for example (which was a big subgroup) in a two-year-old, within a very short period of time, a year or two, three at the outside, that shunt is either going to be gone or completely insignificant. In the 51 Fontans, you did do additional shunting in 11 of the 51, but in 40 you did not. So what was your thinking there? If the goal was to prolong things as far as possible, why did you not do an extra shunt in the other 40 to prolong things even further?

**Dr Vouhé:** I think that the main decision-making point was ventricular function. Obviously, one of the problems with this approach is to avoid significant overloading of the ventricle. When ventricular function was very good, we tended to place another shunt. When ventricular function was borderline, the first option was to go immediately towards Fontan completion.

**Dr Hanley:** So that was the thinking behind it. There was specific thinking among those 51 patients whether or not to go with another shunt?

**Dr Vouhé:** Yes.

**Dr Hanley:** So if the horse was running fast, you continued with another shunt. If things were slowing down, you went to the Fontan?

**Dr Vouhé:** Yes.

**Dr Hanley:** All right. I do not know if there are other questions. I mean, I have a couple of other thoughts having had the opportunity to read the manuscript. If there are other people, I will defer, but I do have a couple of other thoughts.

You also showed that in terms of late ventricular failure, one of the risk factors was antegrade extra source of pulmonary blood flow but not retrograde source of pulmonary blood flow. That is the exact opposite of what I would have thought because with a B-T shunt, you have got diastolic runoff, potentially coronary insufficiency, and I would think with equal size shunts, your ventricle would be better preserved with antegrade extra flow, not retrograde through a shunt. But your study found the exact opposite. What is your thought behind that?

**Dr Vouhé:** This is exactly the opposite of what was said by your paper from some years ago. As you could see from our paper, the statistical significance was very low. Maybe it is due to the small number of patients. I have no clear explanation for that.

**Dr Hanley:** I guess I have then, just one more comment. I think everybody agrees that Fontans are not perfect, and that once you do a Fontan, the clock does start ticking. But that is slightly over-simplistic because it is not as though everybody is great until you do the Fontan and then the clock starts ticking. There is another clock that is ticking before the Fontan, and it is a complex interplay of waiting long enough but not waiting too long before starting the Fontan in order to get the best long-term outcome.

I do not know that anybody has ever had a series where they have said let's just do cavopulmonary shunts with no extra source of flow and then let them go as long as possible. Who knows how long they could go before doing a Fontan. We all jump into the Fontan essentially as early as possible. I do not know that that is the right thing, but maybe we ought to do a study where we do not do an extra source and see how far we can go before doing the Fontan.

**Dr Vouhé:** You are perfectly right. The bad thing is to be born with a single ventricle.

**Dr S. Qureshi** (London, UK): Frank, before you sit down, can I ask - I know it is not your paper, but just to get the other side of it. Are there any patients in your practice where you do exactly what Pascal was doing, which is additional pulmonary blood flow?

**Dr Hanley:** Generally we do not. Our general approach is to try to unload the ventricle completely and not do an extra source of pulmonary blood flow, and usually that will mean even if there is antegrade flow, we will get rid of it for the most part. But there is the occasional Glenn patient where you do the Glenn, and you are too desaturated in the operating room, then we will leave an extra source only for a need for oxygenation. That is pretty much the way we would approach it.

**Dr Qureshi:** Yes, okay.

**Dr T. Ebels** (Groningen, Netherlands): Our policy is to do the Fontan procedure when the patients become symptomatic, so as early as is possible. We have a series of 57 patients in which we left additional pulmonary blood flow together with the bidirectional Glenn, and the effect of that is essentially only that when we do the Fontan, we can fit in a larger prosthesis.

So if you accept that the size of the prosthesis is important for the Fontan, then that may be an advantage depending on how large the patient will become. Because as you well know, somebody that will remain small might not need as large a prosthesis as a giant. So I think it is all about the anticipated size of the patient.

So there is some advantage in the additional pulmonary blood flow, in that it might permit us to postpone the Fontan, rather, and fit a large prosthesis.

## 2.2 Méthodes alternatives

### 2.2.1 La Totalisation de Fontan par chirurgie hybride

L'objectif de ce travail a été tout d'abord de définir un modèle nous permettant de simuler un protocole chirurgical de pré-conditionnement viable avec la vie de l'animal, et permettant de simuler la procédure de totalisation de Fontan par voie percutanée. Cette dernière procédure devait retranscrire les difficultés techniques d'une part, et surtout les contraintes anatomiques d'autre part, telles que la gestion des risques de sténose cavo-pulmonaire, la migration du stent, la survenue de thrombose. Enfin, nous devons valider que notre protocole de pré-conditionnement chirurgical serait compatible avec la croissance.

#### 2.2.1.1 Matériel et méthode

Etude expérimentale animale, développant et évaluant la sécurité, l'efficacité et la reproductibilité d'une procédure hybride de totalisation de Fontan adaptée à la croissance.

- Développement d'un modèle animal permettant de mimer une totalisation de Fontan par voie percutanée (article 2).
- Etude animale chronique de faisabilité et d'efficacité d'une totalisation de Fontan par voie percutanée extra- et intracardiaque (article 3).
- Etude animale préclinique (en croissance) d'une totalisation de Fontan par voie percutanée extracardiaque (article 4).

### 2.2.2 Approche énergétique et du stress oxydant dans le cœur

L'objectif de ce travail est de comprendre le métabolisme énergétique myocardique, afin d'analyser les phénomènes mal adaptifs conduisant à une défaillance myocardique. Cette approche énergétique musculaire du cœur sain soumis à un stress et en décharge, s'inscrit dans la perspective d'optimiser la fonction musculaire d'un cœur univentriculaire, en augmentant son rendement énergétique. Par cette même approche, plus large néanmoins, pour soulager la dépense énergétique du cœur univentriculaire, nous envisageons la conception d'un tube pulsatile travaillant en parallèle et produisant un débit pulmonaire pulsé.

#### 2.2.2.1 Matériel et méthode

- a. L'étude énergétique d'un cœur sain, soumis à des conditions de charges variables:

- i. Cœur sain : Analyse de la fonction mitochondriale des couches musculaires épocardiques et endocardiques (article sous presse)
  - ii. Cœur soumis à une augmentation de travail en pression (article 5)
  - iii. Cœur en décharge ventriculaire.
- c. Etude préliminaire de faisabilité pour la conception d'un tube pulsatile extracardiaque avec le muscle grand dorsal chez l'ovin.
  - i. Conception d'un tube pulsatile modèle In-vivo
  - ii. Conception d'un tube pulsatile modèle Ex-vivo

# Troisième partie

## Résultats

## 3 Résultats

### 3.1 Elaboration expérimentale d'une totalisation de Fontan par une approche hybride

### 3.2 Conception d'un modèle animal

Dans cette partie nous allons nous attarder sur la description d'un modèle animal fiable, reproductible et la conception d'une technique hybride modifiée. Ceci représente la base nécessaire afin de mettre en place une totalisation de Fontan percutanée, donnant des résultats pertinents.

#### 3.2.1 Travaux expérimentaux d'approche

##### 3.2.1.1 Problématique

L'étude de Metton et al. [90] représente une des bases de notre travail et nous tenons donc à l'exposer ici. Elle a consisté en la création d'une technique chirurgicale de pré-conditionnement modifiée, permettant de préparer les patients pour une totalisation de Fontan par cathétérisme interventionnel.

##### 3.2.1.2 Préparation technique

La première étape a consisté à développer un stent couvert dilatable, occlus dans sa lumière par une membrane en PTFE.

Des anneaux en nitinol ont également été créés.

Il a été ensuite fabriqué des stents couverts, en plaçant manuellement une fine membrane en PTFE à l'intérieur, ainsi qu'à l'extérieur de ce dernier.



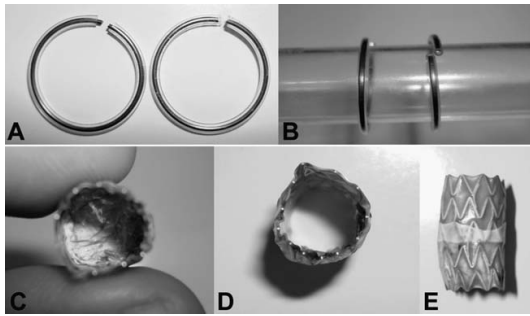


Figure 12 – Anneaux et stents couverts

A et B : anneaux seuls et autour d'un tube en verre. C et E : le stent occlusif est présenté en vue frontale et longitudinale. Une membrane en PTFE est présente au centre du stent (C). (D) Le stent après l'ouverture de la membrane. E : vue longitudinale du stent

### 3.2.1.3 Préparation chirurgicale

Une anastomose termino-latérale est effectuée entre la VCS et l'AP chez seize moutons. Un stent occlus par une membrane de PTFE, est interposée et anastomosée entre la jonction cavo-atriale et l'artère pulmonaire.

Deux anneaux en nitinol ont été fixés au pied la veine cave inférieure (VCI), juste sous la jonction cavo-atriale inférieure. Ces anneaux étaient distants d'environ 1 centimètre.

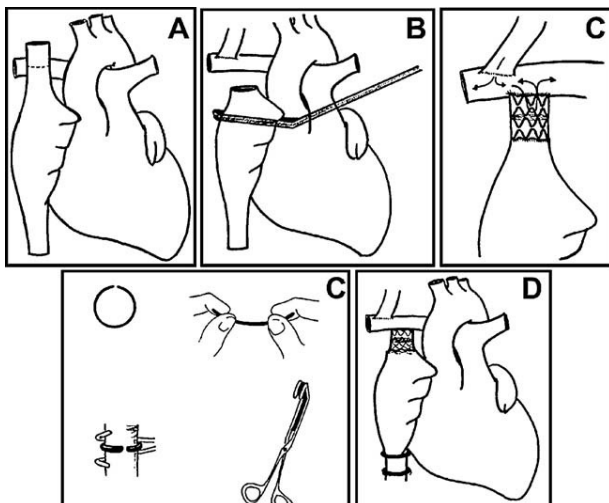


Figure 13 – Vues schématiques de chaque étape de la procédure

A et B : étapes de pré-conditionnement. La VCS sectionnée en évitant le nœud sinusal. La VCS est anastomosée à l'artère pulmonaire droite. C : Un stent occlus par une membrane de PTFE, est interposé et anastomosé entre la jonction cavo-atriale et l'artère pulmonaire. D et

E : deux anneaux sont placés autour de la VCI, entre la jonction cavo-atriale inférieure et les veines hépatiques.

#### 3.2.1.4 Intervention

Suite à cette préparation chirurgicale par cathétérisme, il a été réalisé par voie veineuse fémorale droite et jugulaire interne, immédiatement après la procédure chirurgicale, un contrôle angiographique pour s'assurer du bon positionnement du stent et des anneaux.

Ensuite, la membrane occluant le stent, située au niveau supérieur, était perforée, puis le stent était dilaté. Enfin des stents couverts étaient déployés entre le stent préalablement perforé et la VCI, au niveau des anneaux en nitinol, en vue de réaliser une totalisation de Fontan.

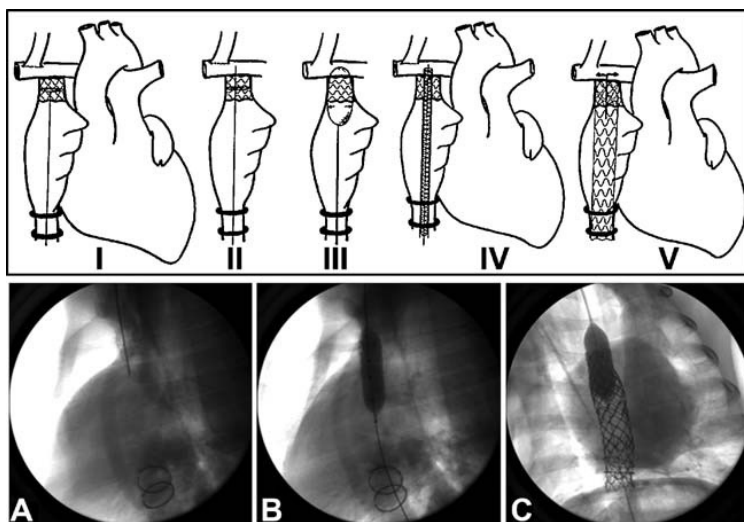


Figure 14 – Différentes étapes de l'intervention

Figures du haut : vues schématiques ; Figures du bas : vues angiographiques.

A : La membrane du stent occlus est perforée (I à II). B : Le stent est dilaté (III). C : Des stents couverts sont placés, pour dériver le flux sanguin vers la circulation pulmonaire (IV et V).

#### 3.2.1.5 Résultats et discussion

De nombreuses équipes avaient déjà travaillé sur ce concept de totalisation de Fontan par cathétérisme interventionnel [37, 40, 41, 43], mais il subsistait encore trop d'inconvénients, rendant la procédure peu viable et risquée chez l'homme.

En premier lieu, l'ouverture de la connexion entre la jonction cavo-atriale et l'artère pulmonaire requérait l'insertion d'un stent qui se déployait en partie dans la lumière de

l'artère pulmonaire, pouvant amener à une perte d'énergie considérable. Pour contourner ce problème, les auteurs eurent l'idée de placer un stent occlusif au niveau même de la jonction anastomotique, se confrontant au problème de sténose résiduelle, au prix de devoir dilater et stenter, en encombrant une fois de plus la lumière de l'artère pulmonaire. Le fait que la membrane en PTFE soit positionnée au milieu du stent, sous l'anastomose permet de pallier à cette contrainte.

Par ailleurs, le stent utilisé par nos prédécesseurs n'était pas compatible avec de grands diamètres, au risque d'une migration de ce dernier. Le stent utilisé dans notre protocole peut lui se dilater jusqu'à un diamètre de 22mm.

Deuxièmement, il a été décrit des exclusions des veines sus hépatiques, ainsi que des fuites à l'extrémité inférieure du chenal, au pied de la VCI. Les stents en nitinol fournissant un marqueur précis, et servant de point d'ancrage, ont permis un déploiement et une assise du stent couvert au pied de la VCI, sans pour autant recouvrir les veines sus hépatiques.

Pour finir, la dernière modification de cette technique est liée au stent couvert. Actuellement, ces derniers ont un revêtement extérieur collé uniquement aux extrémités. Dans une totalisation de Fontan par voie percutanée, le PTFE n'est pas supporté par la paroi vasculaire. Il a donc été ajouté une membrane tout autour des parties interne et externe du stent, pour réaliser un vrai conduit.

#### 3.2.1.6 Conclusion

Il a été réussi une technique de totalisation de Fontan par voie percutanée chez l'animal en phase aigüe, résolvant de nombreux points techniques essentiels à cette procédure.

Cependant, malgré ces résultats préliminaires encourageants, il s'avère nécessaire de tester cette procédure dans le temps, afin d'évaluer la fiabilité de ces innovations techniques. Or, la réalisation d'une telle procédure de dérivation cavo-pulmonaire chez l'animal n'est pas compatible avec sa survie.

### 3.2.2 Conception d'un modèle animal fiable et reproductible

#### 3.2.2.1 Introduction

Si le développement de la chirurgie de Fontan a amélioré de manière significative la survie des patients, les multiples temps chirurgicaux affectent négativement la qualité de vie des patients. La complexité et les vastes possibilités d'améliorations chirurgicales dans la prise

en charge du cœur univentriculaire, ont inspiré certaines techniques très créatives, afin de préparer le cœur pour une palliation ultérieure par voie percutanée [37-44, 90].

Malgré plusieurs études expérimentales ou cliniques publiées sur le développement de la préparation chirurgicale et de la chirurgie de Fontan par voie percutanée, il n'y a pas de modèle animal viable reproduisant les contraintes techniques d'une totalisation de Fontan par voie percutanée. Les modèles non viables rapportés par le passé ont échoué, ne permettant pas l'évaluation à long terme de la dérivation cavo-pulmonaire totale et de ces anastomoses lors d'une procédure par voie percutanée [44, 90]. Ainsi les complications à distance, migration de stent, sténose anastomotique, endofuite, thrombose, rupture de dispositif, etc. demeurent non étudiées. Les études cliniques ont permis de relever uniquement les problématiques techniques, survenant à court et moyen terme, permettant essentiellement d'affirmer que la totalisation de Fontan par voie percutanée était possible sans pour autant garantir la viabilité de la technique à long terme. Il est donc resté difficile de faire évoluer la technique positivement chez l'homme, sans soulever des problèmes éthiques.

Ainsi, nous avons étudié la faisabilité de création d'un modèle ovin viable, reproduisant les contraintes techniques d'une totalisation de Fontan par voie endovasculaire. Notre étude avait pour but de créer un modèle chirurgical d'une circulation cavo-pulmonaire partielle, permettant de reproduire la phase de pré-conditionnement chirurgical d'une totalisation de Fontan par voie percutanée, en vue d'évaluer à long terme cette technique et de l'améliorer au besoin.

#### 3.2.2.2 Méthodes

Dix moutons ont subi une interruption totale au niveau de la jonction entre la VCS et l'AD grâce à une membrane en PTFE. Un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> où l'auricule droit est directement anastomosé, juste en amont de la membrane en PTFE permettant de dériver le flux cave supérieur dans l'AD, pour contourner l'occlusion causée par la membrane en PTFE, et ainsi permettre un drainage veineux normal. Cet artifice permet de simuler la contrainte technique que représente l'anastomose cavo-atriale pulmonaire lors d'une dérivation cavo-pulmonaire totale. Deux anneaux en nitinol ont été posés autour de la VCI, en amont de l'ostium des veines sus-hépatiques, et proche de son abouchement dans l'AD. Ces anneaux servent de marqueurs radio-opaques, pour permettre un placement précis ainsi que de point d'ancrage pour le stent couvert, lors de la totalisation ultérieure par voie percutanée.

La totalisation de Fontan par voie percutanée a été réalisée à 1, 3, 6 et 9 mois selon la technique décrite précédemment [90]. Un animal a servi de sujet contrôle. Ce dernier n'a donc pas subi de totalisation.

Pour le protocole d'étude, les animaux ont été euthanasiés et autopsiés à 1, 3, 6 et 9 mois après l'intervention. L'animal ayant servi de contrôle, a toutefois été lui euthanasié 12 mois après la phase de pré-conditionnement chirurgical.

### 3.2.2.3 Résultats et discussion

Les trois premières procédures ont été un échec, essentiellement lié aux contraintes techniques dans la conception de la dérivation cavo-atriale supérieure. Le reste des procédures a été un succès. L'euthanasie en fin de suivi n'a révélé aucune sténose anastomotique ou thrombus.

L'équipe de Konertz et Hausdorf [39, 40], fut la première à tenter de décrire la réalisation d'un Fontan par voie percutanée. S'en est suivi diverses équipes [37, 41-44], qui ont à chaque fois essayé d'améliorer l'intervention. Malgré les résultats prometteurs qu'ils ont obtenu, des questions à propos de la technique chirurgicale idéale pour préparer le cœur univentriculaire, ou phase dite de pré-conditionnement chirurgical à la totalisation percutanée, n'ont pas pu être résolues. Le modèle réalisé nous permet de simuler les contraintes techniques cavo-pulmonaire supérieure et cavo-atriale inférieure lors d'une procédure de totalisation endovasculaire sans pour autant modifier l'anatomie et la physiologie de l'animal, garantissant sa survie et la possibilité d'évaluer à long terme cette procédure.

### 3.2.2.4 Implications cliniques

Nos résultats nous laissent donc croire que notre modèle animal imite l'étape préparatoire d'une chirurgie de Fontan en vue d'une totalisation de Fontan par voie percutanée. En effet, après un court apprentissage, la technique s'avère efficace et reproductible. Ce modèle pourrait donc permettre de tester divers protocoles de dérivation cavo-pulmonaire totale hybride, en analysant les résultats à long terme, avant de se projeter chez l'homme [38, 91].

### 3.2.2.5 Conclusion

Nous avons donc pu décrire une nouvelle technique chirurgicale dans le cadre d'une procédure chirurgicale de pré-conditionnement dans un modèle ovin, afin de réaliser une

chirurgie de Fontan par voie percutanée. Cette technique chirurgicale est reproductible, après un court apprentissage, et sans limite majeure. Cela marque donc une nouvelle étape importante dans de futures évaluations de techniques endovasculaire, en vue d'une chirurgie hybride dans la palliation des cœurs univentriculaires.

Le modèle animal que nous avons créé nous ouvre de grandes perspectives, mais il s'agit donc maintenant d'évaluer expérimentalement, de façon longitudinale, une totalisation de Fontan par voie percutanée.

Ce travail a été publié dans « The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery ». Ci-après une version de l'article est donnée.

## Feasibility of creating a novel animal heart model to test transcatheter techniques for a cavocaval connection that mimics a Fontan completion

Sébastien Gerelli, MD,<sup>a</sup> Mathieu Van Steenberghe, MD,<sup>a</sup> Mehul Patel, MD,<sup>a</sup> Isabelle Van Aerschot, MD,<sup>a</sup> and Younes Boudjemline, MD, PhD<sup>a,b</sup>

**Objective:** The objective of this study was to create a novel animal model to foster the future development of interventional techniques for a cavocaval connection that mimics a Fontan completion.

**Methods:** Ten sheep were studied. All had the superior vena cava–right atrium junction closed using a polytetrafluoroethylene membrane. A valveless Gore-Tex conduit connecting the terminal portion of the superior vena cava to the right atrium was used to bypass the polytetrafluoroethylene occlusion and to allow normal venous drainage through the right atrium. Radio-opaque nitinol rings were placed around the inferior vena cava near its entry in the right atrium to allow better fluoroscopic visualization and to enhance stent stability during transcatheter cavocaval connection.

**Results:** The first 3 animals died during the learning curve as a result of technical issues. The subsequent 7 surviving sheep showed good flow dynamics on cardiac catheterization. Transcatheter cavocaval connection was performed successfully in 6 sheep at 0 to 9 months after the initial surgery. Sacrifice was done electively in all animals at 1 to 9 months per protocol. One animal was euthanized early because of an untreatable infection. One sheep was observed as a control without a transcatheter cavocaval connection and was sacrificed at 12 months.

**Conclusions:** A novel, chronic ovine model to foster development of transcatheter techniques for cavocaval connection to mimic a Fontan completion was created. The successful model is easily reproducible after a short learning curve and shows good survival. (*J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;146:408-12)

Children with functional univentricular hearts face remarkable challenges during their lifetime. The development of the Fontan operation has improved survival significantly beyond the fourth decade; however, multiple, staged surgeries affect postoperative quality of life negatively in such patients. The complexity and the broad scope of improvement of the univentricular heart have inspired some highly creative surgical techniques to prepare the heart for subsequent transcatheter repair.<sup>1-10</sup> The interest to perform transcatheter completion of Fontan stems from the need to reduce the number of surgeries in these patients. The interventional armamentarium with the advent of stents has revolutionized the field of pediatric cardiology drastically. The use of stents

has evolved from simple a bailout of a stenosis or obstruction to an alteration of flow dynamics to achieve optimal physiology. Despite several experimental studies published on the development of surgical preparation and transcatheter Fontan completion, there is conspicuous lack of data on the creation of a viable, chronic animal model for testing transcatheter techniques for cavocaval connection in Fontan completion. The nonviable models reported in the past failed to show long-term assessment of the surgical pathway.<sup>7,8</sup> Delayed and long-term complications such as thrombus formation, device fracture, failure, and so forth, remain unstudied.

We report the feasibility for creating a chronic, viable ovine heart model. Our study was intended to simulate a surgical substrate of partial cavopulmonary circulation and to describe the challenges faced during the evolution and creation of the surgical model that may allow development and long-term assessments of newer techniques for transcatheter cavocaval connection.

### METHODS

Our study was performed in accordance with the *Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals* and was approved by the Subcommittee on Research Animal Care and the local institutional ethics committee (INRA, Paris, France).<sup>11</sup> All animals received humane care in compliance with the European Convention on Animal Care.

From the Centre de Référence Malformations Cardiaques Congénitales Complexes—M3C,<sup>a</sup> Necker Hospital for Sick Children, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Pediatric Cardiology, Paris, France; and the Université Paris Descartes,<sup>b</sup> Sorbonne Paris Cité, Paris, France.

This work was supported by the Fondation de l'Avance.

Disclosures: Authors have nothing to disclose with regard to commercial support.

Received for publication March 23, 2012; revisions received Sept 10, 2012; accepted for publication Sept 21, 2012; available ahead of print Oct 24, 2012.

Address for reprints: Younes Boudjemline, MD, PhD, Necker Hospital For Sick Children, Pediatric Cardiology, 149 rue de Sévres, 75015 Paris Cedex, France (E-mail: younes.boudjemline@nck.aphp.fr).

0022-5223/\$36.00

Copyright © 2013 by The American Association for Thoracic Surgery

http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2012.09.059



**Abbreviations and Acronyms**

IVC	= inferior vena cava
PA	= pulmonary artery
PTFE	= polytetrafluoroethylene
RA	= right atrium
SVC	= superior vena cava

**Surgical Technique**

Ten consecutive sheep were studied after improvisation of surgical technique from an earlier experience. Standard premedication, anesthesia induction, endotracheal intubation, and ventilation were achieved in all sheep. Anesthesia was maintained with 2% halothane. The heart was exposed through a conventional right thoracotomy and no extracorporeal circulation was used. All sheep underwent total interruption of the superior vena cava (SVC)-right atrium (RA) junction by a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane. A nitinol wire was preshaped to an open ring and sized with approximation to fit the inferior vena cava (IVC) snugly. Two open nitinol rings were placed around the IVC distal to the opening of the hepatic veins and near its entry to the RA. The rings served as radio-opaque markers for precise placement as well as an anchor of a covered stent for subsequent transcatheter completion. All sheep underwent placement of a valveless Gore-Tex conduit that connected the terminal portion of the SVC to the RA to divert and bypass the PTFE occlusion and allow normal venous drainage (Figure 1, D).

**Transcatheter Completion**

We planned to perform transcatheter completion at 1, 3, 6, and 9 months after the initial surgery. One animal was planned as a control with no transcatheter completion. The technique of completion has been reported previously.<sup>8</sup> Briefly, cardiac catheterization was performed using both the right femoral and internal jugular veins. A catheter was placed in contact with the membrane separating the SVC and the RA. The stiff end of a guidewire was pushed through the membrane. After perforation of the membrane, a balloon catheter was inflated at the level of the membrane. Several covered stent grafts mounted on a 22-mm balloon catheter were deployed to bridge the gap between the opened SVC and the radio-opaque nitinol rings at the IVC-RA junction. Selective angiographies were performed to confirm the absence of flow from the SVC to the RA, after reestablishing the pathway between the SVC and the RA, and after transcatheter cavocaval connection.

**Sacrifice**

Per study protocol, euthanasia was planned at 1, 3, 6, and 9 months after completion, or at 12 months after surgical preparation in the animal without transcatheter completion.

**RESULTS**

Ten sheep were used in the study. The first 3 died early as a result of technical issues. Two died from hypovolemic shock secondary to uncontrolled hemorrhage (accidental rupture of anastomosis) before transcatheter completion and 1 died from SVC syndrome as a result of occlusion of the SVC-RA connection after transcatheter completion. The remaining 7 sheep survived the operative procedure and recovered uneventfully. All animals except one underwent transcatheter cavocaval completion at 0 to 9 months after surgery. All animals except one survived transcatheter

completion and were followed 1 to 9 months after the completion (median, 5 months). One animal experienced fever, weight loss and poor feeding after completion secondary to a fulminating infection. The animal was euthanized after 1 week of ineffective treatment with antibiotics. The uncompleted animal was left alive and euthanized 1 year after the initial surgery. Early and late catheterization was done in all surviving sheep and all demonstrated good flow dynamics, with a mean gradient across the SVC pathway between 0 mm Hg and 2 mm Hg.

Cardiac catheterization during the completion steps with assessment of patency of the SVC-RA connection, PTFE membrane perforation, and thus reestablishment of the native SVC-RA connection is highlighted in Figure 2. Subsequent angiographic views after completion showing the covered stents connecting the SVC and the IVC, with redirection of IVC flow, are presented in Figure 3.

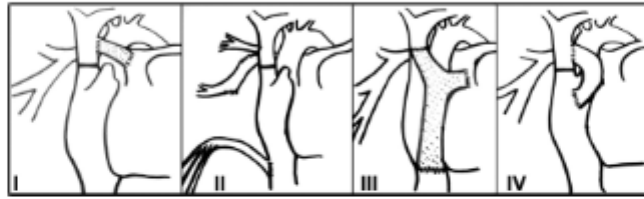
All sheep (except the one described previously) euthanized per protocol demonstrated good health at the time of sacrifice. At macroscopic examination, no thrombus was found at the SVC-RA junction, which remained widely open. In completed animals, all stents were patent with no leakage or thrombus formation (Figure 4). No thrombus was noted in the lungs.

**DISCUSSION**

Hausdorf and colleagues<sup>1,2</sup> were the first to attempt and describe transcatheter completion of a hemi-Fontan using balloon dilatation of the banded cavoatrial junction and fenestration closure using either a covered stent or patent ductus arteriosus occluders. Subsequently, Klima and colleagues<sup>3</sup> developed a new approach by establishing bidirectional Glenn circulation and subtotal banding of the SVC at the cavoatrial junction, along with PTFE cuff placement around the IVC—all performed in the absence of cardiopulmonary bypass. To facilitate placement of the graft stent in the SVC-RA junction, and to avoid residual obstruction around the SVC band site, Galantowicz and Cheatham<sup>4,5</sup> closed the SVC-RA junction by using a pericardial patch for a subsequent intracardiac stent. Konstantinov and others<sup>6,7</sup> modified this further by placing stents at the level of both atriocaval junctions. The atrial SVC was then connected to the inferior face of the unopened right pulmonary artery (PA). The stent at the SVC-PA junction may cover a part of the PA lumen and thus reduce the forward flow. With kinetic energy as the only force to drive the blood in a circuit with resistance in series, and absent a driving pump, any degree of loss of energy reduces cardiac output and vital organ perfusion.

Despite such promising preliminary results of transcatheter completion of Fontan, there are some unanswered questions about the ideal surgical technique to prepare a univentricular heart for subsequent transcatheter techniques. The insertion of foreign material inside the heart,





**FIGURE 1.** Schematic drawings showing all techniques used for the creation of a simulated cavopulmonary sheep heart model. This study presents only the results from view D. Techniques depicted in views A through C resulted in 100% mortality.

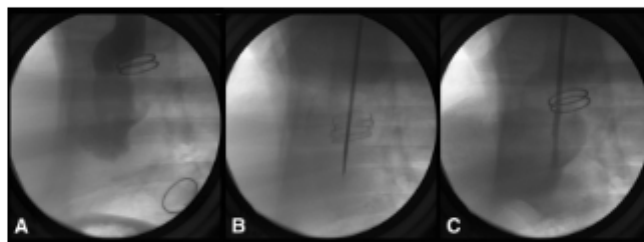
along with the iatrogenic dead space, may favor thrombus formation. Given the fact that univentricular hearts have open connection between the right and left circulation, any thrombus formation in any chamber can be catastrophic. There is a growing need to have a chronic animal heart model to assess such potential complications and the long-term outcomes of transcatheter techniques. In our prior experience we tested various surgical models to simulate Fontan physiology (data not shown). The surgical techniques used included placement of a valveless conduit between the SVC and the main PA; side-to-side bicaval branch PA anastomosis, with the right upper PA branch anastomosed to the SVC and the right lower lobar branch anastomosed to the IVC; and total cavopulmonary bypass with a valveless synthetic Y tube between the 2 vena cava and the main pulmonary artery.

Creation of such surgical models with physiologic simulation of cavopulmonary circulation was highly eventful with no survival beyond 2 hours of surgery (Figure 1, A, B, and C). It was realized that animals would not tolerate bypassing the right ventricle even for a couple hours. To circumvent the problems noted with our early experience, we modified our surgical approach significantly and developed an anatomic model as a platform to test the technical feasibility and the long-term outcomes of transcatheter cavocaval connection for Fontan completion (Figure 1, D).

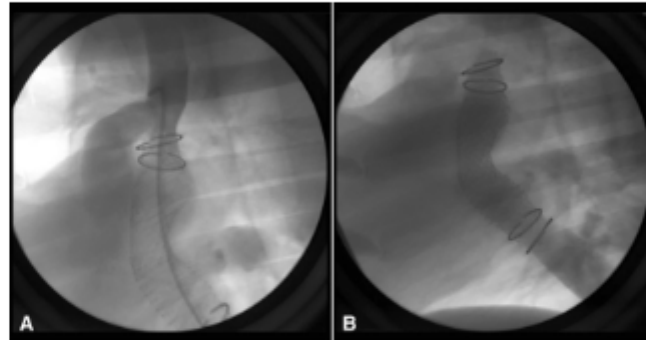
The model from the current study was therefore designed to redirect flow without altering the cardiac architecture or physiology. The results were spectacular and allowed us to test the completion of the cavocaval connection chronically in all animals per protocol.

#### Clinical Implications

We believe our surviving animal anatomic model closely mimics the pre-Fontan preparatory stage of a univentricular heart from an interventional standpoint. The uniform survival with only planned deaths after a short learning curve makes this a good and a reproducible technique. This working model should be suitable to test various transcatheter therapies, including the possibility of hybrid therapies in the future.<sup>9,10</sup> With greater experience it may be possible to create a hybrid strategy with the current model to accomplish intraoperative completion of Fontan in the same setting with significant reduction of crossclamp time and perioperative mortality. We believe this is the only pathway that works well and has good long-term survival. All attempts to create a real-life anatomic and physiologic cavopulmonary connection failed with 100% mortality. The current model proved to be ideal in testing various transcatheter therapies for completion. Each step of the surgical preparation and the subsequent transcatheter completion can be tested with reliable accuracy, including surgical



**FIGURE 2.** Angiographic views showing the perforation steps of the Fontan completion. A, Preliminary dye injection shows the surgical pathway in the animal. The superior vena cava has been connected to the right atrium. The normal superior vena cava-right atrium connection is occluded by a polytetrafluoroethylene membrane. Two rings have been placed around the superior vena cava at the level of the membrane and 2 around the inferior vena cava (only 1 is shown here). B, Perforation of the membrane with a needle. C, Dye injection in the sheath after perforation shows the reestablished connection between the superior vena cava and the right atrium.



**FIGURE 3.** Angiographic views after completion. A, Covered stents have been placed between the superior vena cava and the inferior vena cava. Dye injection in the superior vena cava shows the connection to the right atrium. B, Dye injection in the inferior vena cava shows the contrast going into the covered stents in the superior vena cava connection.

creation of superior connection, placement of markers around the IVC, pliability of the SVC-RA PTFE membrane for various perforation techniques and transcatheter opening of the occluded SVC, and covered stent placement. Moreover, because it is a viable model without significant physiologic alterations, long-term complications can also be assessed and may include thrombus formation secondary to a foreign body and dead space; complications of stent fracture, migration, and dislodgment; damage to the IVC and neighboring structures; impact of the tendinous insertion of the diaphragm at the caval opening with its dynamic motion on the stent; and paraprosthesis leak.

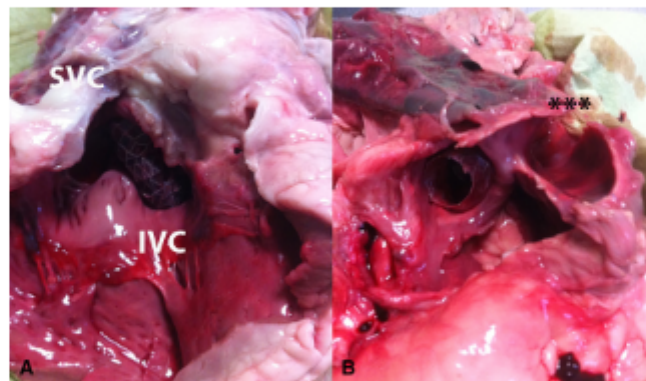
#### Study Limitations

The model we created is not a physiologic model of Fontan circulation because all animals had structurally normal

hearts with a well-developed right ventricle pumping the right circulation. However, it is a good simulated platform to test various transcatheter and hybrid techniques. The potential of thrombus formation in the long run still cannot be ruled out completely; however, none of the surviving sheep had any thrombus formation as of the last follow-up. Moreover, for future clinical applications, a definitive anticoagulation strategy may be required that was not used in any of our animals.

#### CONCLUSIONS

We describe new surgical technique for the preparation for an anatomic ovine heart model for transcatheter completion of Fontan circulation. This surgical technique was easily reproducible after a short learning curve with no major limitations. The novel and successful creation of a viable



**FIGURE 4.** Gross examination of the heart after sacrificing the animal. A, The covered stent running from the superior vena cava (SVC) to the inferior vena cava (IVC). B, The connection between the SVC and the right atrium after retrieval of the IVC stent (\*\*\*)

ovine heart model marks a new milestone in allowing further evaluation of transcatheter and hybrid techniques in univentricular hearts. Additional long-term studies with this model may be required before it may be implemented clinically.

We thank the Fondation de l'Avenir for its financial support.

#### References

1. Hausdorf G, Schneider M, Konertz W. Surgical preconditioning and completion of total cavopulmonary connection by interventional cardiac catheterization: a new concept. *Heart*. 1998;75:403-9.
2. Konertz W, Schneider M, Horwig V, Kampmann C, Waldenberger F, Hausdorf G. Modified hemi-Pontan operation and subsequent nonsurgical Pontan completion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1995;110:865-7.
3. Klima U, Peters T, Fotteler M, Hausdorf G, Haverich A. A novel technique for establishing total cavopulmonary connection: from surgical preconditioning to interventional completion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;120:1007-9.
4. Chatham JP, Galantowicz M, Torres W, Tower AJ, Hill SL, Kleinman CS, et al. The use of custom-made covered NuMed CP stents in the treatment of congenital heart disease. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2002;57:100-1.
5. Galantowicz M, Chatham JP. Pontan completion without surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2004;7:48-55.
6. Konstantinov IE, Moskikhvili VV. Intracardiac covered stent for transcatheter completion of the total cavopulmonary connection: anatomical, physiological and technical considerations. *Scand Cardiovasc J*. 2006;40:71-5.
7. Konstantinov IE, Benson LN, Calderone CA, Li J, Shimizu M, Coles JD, et al. A simple surgical technique for interventional transcatheter completion of the total cavopulmonary connection. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:210-2.
8. Motton O, Calvaruso D, Sios B, Ben Ali W, Boujgenline Y. A new surgical technique for transcatheter Pontan completion. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2011;39:81-6.
9. Hijazi ZM. Intraoperative intervention (hybrid surgery) and intervention in the immediate perioperative period. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;60:99-100.
10. Bacha EA, Marshall AC, McElhinney DB, del Nido PJ. Expanding the hybrid concept in congenital heart surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*. 2007;140-50.
11. Council of Europe. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. Council of Europe Convention ETS No. 123 and Directive 86/609/EEC. Strasbourg, Germany; March 18, 1986.

## 3.3 Evaluation longitudinale expérimentale d'une totalisation de Fontan par voie percutanée

### 3.3.1 Introduction

Nous avons déjà mis en lumière les enjeux d'une amélioration de l'intervention de Fontan. Dans notre précédente étude, nous avons pu décrire une de ces améliorations, avec l'introduction d'un stent occlus, proche de la jonction VCS-AD, pour accroître la stabilité et éviter le recouvrement accidentel de l'artère pulmonaire droite avec une partie du stent couvert [90, 92]. La présente étude décrit des préparations chirurgicales nouvelles et simplifiées, avec l'intention de réaliser une anastomose cavo-cave par voie percutanée chez des modèles de cœurs ovins viables.

### 3.3.2 Méthodes

Seize moutons ont subi des techniques chirurgicales que nous allons décrire ci-après.

#### 3.3.2.1 Modèle chirurgical

Un modèle animal viable a été créé, comme décrit précédemment. Les animaux sont placés en décubitus latéral gauche et le cœur est exposé via une thoracotomie axillaire droite. Un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> de 20 mm a été anastomosé entre la VCS et l'AD, après ligature de la veine azygos. Ici nous évaluons la faisabilité d'une totalisation de Fontan intra- et extracardiaque par voie percutanée.

#### 3.3.2.2 Préparation chirurgicale intracardiaque (groupe 1)

Dix moutons ont subi une préparation chirurgicale, pour simuler une dérivation cavo-cave par voie intracardiaque percutanée. La VCS est occluse par une membrane en PTFE à environ deux centimètre de son ostium entre le site d'anastomose du tube en Gore-Tex<sup>®</sup> et la jonction de l'AD. Deux anneaux en nitinol, espacés de 1 cm, ont été fixés autour de la VCS, de part et d'autre de la membrane en PTFE juste sous l'anastomose avec le tube. Enfin, deux autres anneaux en nitinol ont été fixés autour de la VCI, proche de son entrée dans l'AD.

#### 3.3.2.3 Préparation chirurgicale extracardiaque (groupe 2)

Six moutons ont subi une préparation chirurgicale, pour simuler une dérivation cavo-cave extracardiaque par voie percutanée. Un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> de 20 mm a été anastomosé entre la VCS et la VCI. L'anastomose de la VCI a été effectuée de façon termino-latérale, et

termino-terminale au niveau de la VCS. Les deux extrémités du tube en Gore-Tex<sup>®</sup> ont été obturées, grâce à l'utilisation d'une membrane en PTFE et le tube purgé par une solution saline. Des anneaux en nitinol ont été positionnés de chaque côtés de la ligne anastomotique de la VCS et de la VCI, et aussi sur le tube en Gore-Tex<sup>®</sup>, pour identifier son trajet par rapport aux membranes en PTFE en fluoroscopie.

#### 3.3.2.4 Totalisation cavo-cave par voie percutanée.

Après une période d'intérim d'une durée médiane d'un mois, les animaux ont été repris pour réaliser une totalisation cavo-cave par voie percutanée.

Dans le groupe 1, des stents couverts ont été placés entre les anneaux en nitinol de la VCS à la VCI afin de réaliser la dérivation totale cavo-cave.

Dans le groupe 2, les deux membranes en PTFE ont été perforées. Ensuite, des stents couverts sont placés entre les anneaux en nitinol, en occluant complètement l'ostium natif de la VCI et en redirigeant le flux dans le tube en Gore-Tex<sup>®</sup>, comme dans la procédure de Fontan extracardiaque.

#### 3.3.2.5 Suivi après l'intervention par voie percutanée

Les animaux ont été sacrifiés après la phase de totalisation entre 0 et 8 mois. Avant le sacrifice, des angiographies sélectives ont été effectuées pour confirmer : l'absence de fuites paraprothétiques, des shunts résiduels et une analyse hémodynamique. L'analyse anatomique était réalisée pour vérifier l'absence de thrombus, ou de migration des stents.

### 3.3.3 Résultats et discussion

Quatre animaux sont morts dans les suites de la phase de pré-conditionnement du Groupe 1, 3 précocement et 1 tardivement. L'ensemble des procédures de totalisation a été un succès dans le groupe 1 et 2. Le suivi médian était de 4 mois, il n'a pas été constaté de fuite paraprothétique, thrombus, sténose anastomotique ou migration de stent. Un seul animal du groupe 1 présentait un gradient trans-cave de 3 mmHg.

Dans le groupe 1, suite à la phase de pré-conditionnement chirurgical, trois animaux sont morts à la phase précoce, dont deux liés à des vices techniques lors de la création de la dérivation cavo- atriale avec le tube de Gore-Tex<sup>®</sup>.

Dans le groupe 2, un animal est mort quatre mois après la préparation chirurgicale. De fait, six moutons ont survécu à la procédure et ont bien récupéré, cependant, l'un d'eux a subi une totalisation prématurée, compte tenu de la survenue d'un pneumothorax récurrent.

Enfin, dans les deux groupes il a été retrouvé l'absence de gradient de pression cavo-cave. Seul un animal du groupe 1 a montré un gradient modéré (3 mmHg) mais lié non pas à la connexion cavo-cave, mais à une sténose résiduelle de l'anastomose entre le Gore-Tex<sup>®</sup> et l'AD, du fait des bandelettes pectinées de l'auricule droit qui n'avaient pas suffisamment été réséquées. Lors du suivi, avant le sacrifice, aucune anomalie n'était à noter dans les deux groupes.

Le modèle extracardiaque développé lors de la phase de pré-conditionnement chirurgical était simple et reproductible ; reproduisant à l'identique la procédure chirurgicale actuelle qui reste la référence.

#### 3.3.4 Limitations

Aucune des contraintes physiologiques inhérentes à une circulation de Fontan n'est représentée par notre modèle, telles que l'augmentation de l'hématocrite et du risque pro-thrombogène, ou encore une oreillette droite fonctionnelle sans anomalie de la valve atrio-ventriculaire droite, sans le risque de voir la survenue d'une embolie paradoxale. Les résultats sur notre modèle intracardiaque doivent donc être interprétés avec prudence. Notre modèle extracardiaque ne présente pas ce type de biais, et outre la difficulté, la critique essentielle reste la solution saline stagnante, durant la période d'intérim, dans un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> occlus de part et d'autre.

#### 3.3.5 Conclusion

Ces deux techniques de totalisation par voie percutanée, sont sûres, réalisables, avec un taux de complication à moyen terme, nul. De telles techniques devraient pouvoir être reproductibles chez l'homme, marquant un nouveau tournant dans la prise en charge des patients avec un cœur univentriculaire. Si l'approche extracardiaque est séduisante, il n'en reste pas moins que la gestion de l'implantation chez un enfant d'un tube de Gore-Tex<sup>®</sup> permettant la réception du flux cave inférieur à l'âge adulte sera le défi essentiel de cette technique, outre le problème de laisser stagner un sérum salin dans un conduit inerte.

Il convient donc d'évaluer la faisabilité d'un pré-conditionnement chirurgical extracardiaque sur un modèle en croissance.

Ce travail a été publié dans « European Journal of Cardio-Thoracic Surgery ». Ci-après une version de l'article est donnée.



## Feasibility of transcatheter techniques for intracardiac and extracardiac cavocaval connection in principle for Fontan completion in chronic animal models

Younes Boudjemline<sup>a,b,\*</sup>, Sébastien Gerelli<sup>a</sup>, Mathieu Van Steenberghe<sup>a</sup>, Mehul Patel<sup>a</sup>,  
Sophie Malekzadeh-Milani<sup>a</sup> and Damien Bonnet<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Centre de Référence Malformations Cardiaques Congénitales Complexes—M3C, Necker Hospital for Sick Children, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, Pediatric Cardiology, Paris, France

<sup>b</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

\* Corresponding author. Hôpital Necker Enfants Malades, Cardiologie Pédiatrique, 149 rue de Sévres, 75015 Paris Cedex, France. Tel: 331-44-494357; fax: +331-44-495724; e-mail: younes.boudjemline@nck.aphp.fr (Y. Boudjemline).

Received 8 May 2012; received in revised form 24 June 2012; accepted 28 June 2012

### Abstract

**OBJECTIVES:** We report the safety and feasibility of various transcatheter techniques of cavocaval connection in principle for the completion of Fontan circulation in viable, chronic and ovine heart models. Surgically simulated preparations of both intracardiac and extracardiac cavocaval connections were studied.

**METHODS:** Sixteen sheep were divided into two groups per the type of surgical preparation. All animals underwent standard right thoracotomy with interposition of a 20-mm Gore-tex<sup>®</sup> conduit between the superior vena cava (SVC) and the right atrium (RA). Nitinol rings were placed around the SVC and the inferior vena cava (IVC). In Group I (intracardiac, *n* = 10), the SVC-RA junction was closed using a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane 1 cm below the SVC-Gore-tex<sup>®</sup> anastomosis. In Group II (extracardiac, *n* = 6), a 20-mm Gore-tex conduit de-aired and filled with heparinized saline was anastomosed to connect the SVC and the IVC. The IVC end was anastomosed in a termino-lateral fashion and the SVC end in a termino-terminal fashion; both the ends were occluded with a PTFE membrane. Animals were scheduled for transcatheter cavocaval connection after a variable healing period.

**RESULTS:** Four animals in Group I died; three early and one late after surgical preparation. After a median interim period of 1 month (0–9 months), five sheep from Group I and six from Group II underwent successful transcatheter cavocaval connection. Perforation of the PTFE membrane was successful in all animals. Covered stents were deployed precisely and with good stability ensured by the nitinol rings. All animals survived transcatheter completion and were sacrificed after a median follow-up of 4 months (0–8 months) per protocol. No stent migration, thromboembolic events, residual shunts or paraprosthetic leak was noticed on angiographic evaluation or at autopsy in any animal.

**CONCLUSIONS:** Transcatheter techniques for completion of cavocaval connection in surgically simulated, chronic animal models is safe and feasible. Both techniques were equally successful with no failures or short-term complications. Such techniques should work in principle for completion of intracardiac and extracardiac Fontan circulation.

**Keywords:** Fontan circulation • Transcatheter completion • Hybrid approach • Congenital heart diseases

### INTRODUCTION

Significant improvements in the management of children with various single ventricle morphologies have led to better long-term survival over the last couple of decades [1–5]. In the absence of septation or biventricular repair the goal of surgery is to separate pulmonary and systemic circulations; at first by connecting the superior vena cava (SVC) and the pulmonary artery and finally by connecting the inferior vena cava (IVC) to the pulmonary artery commonly known as the Fontan pathway [6]. However, repeated surgeries increase cost, morbidity, mortality and significantly impact the quality of life of these patients with

poor cardiopulmonary reserve [7, 8]. The need to reduce the number of surgeries prompted various groups to try some creative and indigenous transcatheter techniques [9]. However some concerns on the long-term effectiveness have been highlighted [10]. Our prior study described an improvement with the introduction of an occluded stent near the SVC-right atrium (RA) junction to enhance the stability and avoid accidental covering of the right pulmonary artery (RPA) with the strands of the covered stent placed during subsequent transcatheter completion [11, 12]. The present study describes newer, simplified surgical preparations, with the intention of transcatheter completion of cavocaval connection in viable, chronic ovine heart models.



## METHODS

All animals received humane care in compliance with the European convention on animal care. After approval by the local institutional ethics committee (INRA, Paris, France), 16 sheep underwent surgical techniques as described below.

### Surgical model

A viable, chronic model was created as described in our previous article [11]. Standard premedication, anaesthesia induction, endotracheal intubation and ventilation were achieved in 16 sheep weighing  $55 \pm 7$  kg. Anaesthesia was maintained using halothane (1.5–2.5%) with continuous monitoring of arterial pressure, oxygen saturation and cardiac rhythm. The animal was placed in left lateral decubitus and the heart exposed via right axillary thoracotomy. A Gore-tex<sup>®</sup> conduit of 20 mm was anastomosed between the SVC and the RA after closing the azygos vein. Further modification of the surgical technique was based on study design and the type of pathway proposed: intracardiac or extracardiac for cavocaval connection. After the surgical preparation, animals from both groups were extubated and allowed to heal at the sheepfold for a variable interim period: median of 1 month (range 0–9 months), without any anticoagulation.

### Intracardiac surgical preparation (Group I)

Ten sheep underwent further surgical preparation to simulate a cavocaval connection of an intracardiac Fontan on completion using transcatheter totalization. The proximal 2 cm of SVC

between the Gore-tex<sup>®</sup> anastomotic site and the junction of RA was transected in its middle, occluded by a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane and re-sutured. Two nitinol rings spaced 1 cm apart were fixed around the proximal SVC stump on either side of the interrupted zone, just below the Gore-tex<sup>®</sup> anastomosis. Finally, two nitinol rings were fixed around the IVC near its entry into the RA (Fig. 1A).

### Extracardiac surgical preparation (Group II)

Six sheep underwent further surgical preparation to simulate cavocaval connection of an extracardiac Fontan on completion using transcatheter totalization. A 20-mm Gore-tex<sup>®</sup> conduit, de-aired and filled with heparinized saline was anastomosed between SVC and the IVC (Figs 1B and 2). The IVC anastomosis was done in a termino-lateral fashion and the SVC end in a termino-terminal fashion. The SVC and the IVC end of the Gore-tex<sup>®</sup> conduit was occluded using a PTFE membrane. Nitinol rings were stretched and positioned on either sides of the SVC and IVC anastomotic line and also on the Gore-tex<sup>®</sup> conduit to identify its course with respect to the PTFE membrane on fluoroscopy.

### Interventional catheter completion

All cardiac interventions were performed under general anaesthesia with right femoral and internal jugular vein (IJV) accesses (7Fr) obtained in all. All animals underwent an initial angiogram to confirm flow across the SVC to RA conduit and create a road

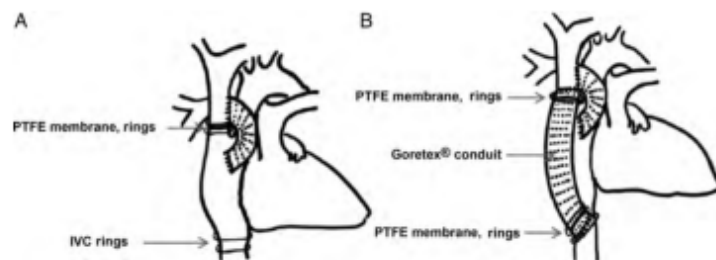


Figure 1: (A) Schematic view showing the final surgical preparation for intracardiac cavocaval connection. (B) Schematic view showing the final surgical preparation for extracardiac cavocaval connection.

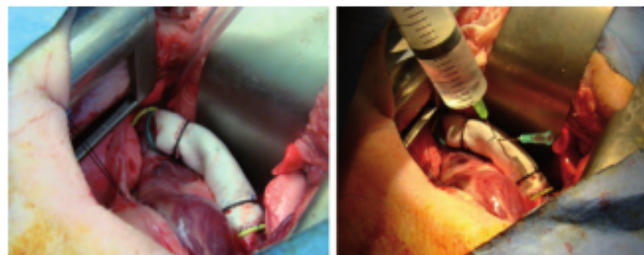


Figure 2: Extracardiac conduit is shown before (left) and after (right) filling with saline. Note the connections with the SVC and IVC as well as the metallic ring around the SVC and IVC anastomosis.

map for the precise placement of covered stents. In Group I, a 5-Fr right Judkins catheter was placed under fluoroscopy from the right IJV, in contact with the PTFE membrane separating the SVC and RA. The stiff end of a 0.035 guide wire was advanced through its lumen to perforate the membrane. The use of a radio-frequency wire for perforation was kept as a backup; however, it was never required. The catheter was advanced in the RA over the wire and the soft end of the guide wire was advanced into the IVC. A 16-Fr Mullins sheath was advanced over the guide wire into the IVC. Using this as the delivery sheath, a mean of three covered stents grafts (CP, Numed Inc. or Atrium V12) were placed between the SVC and IVC nitinol rings; precise placement was ensured to avoid little margin for error in accidentally covering the anastomosis between SVC and Gore-tex<sup>®</sup> conduit above and the hepatic vein drainage below.

In Group II, a 5-Fr right Judkins catheter was placed from the right IJV access under fluoroscopy, in contact with the PTFE membrane separating the SVC from the saline filled cavocaval Gore-tex<sup>®</sup> conduit. Through its lumen, the stiff end of a 0.035 guide wire was advanced to perforate the membrane. The catheter was advanced in the Gore-tex<sup>®</sup> conduit and the PTFE membrane at the IVC end perforated as well. The catheter was advanced over the wire and the wire was then reversed to advance the soft end further into the IVC. The occluding membranes were dilated with a balloon catheter to facilitate stent placement. Thereafter, a 16-Fr Mullins sheath was advanced over the guide wire into the IVC. Through this long sheath, covered stents grafts were placed between the nitinol rings completely occluding the native IVC ostium and redirecting flow into the cavocaval Gore-tex<sup>®</sup> conduit as in the extracardiac Fontan procedure and also at the superior connection with the SVC.

#### Follow-up after transcatheter completion

All animals were sacrificed per study protocol at last follow-up with a median of 4 months (range 0–8 months). Before the sacrifice, selective angiographies were performed to confirm (i) the absence of native flow from SVC and IVC into RA with no paraprothestic leakages, (ii) intracardiac or extracardiac leaks from the neo-conduit, (iii) patency of initial SVC–RA Gore-tex<sup>®</sup> conduit with no overlap by the strands of the covered stent, (iv) patency of the hepatic venous drainage and (v) analyse haemodynamic flow into the montage.

## RESULTS

#### Early results after surgical preparation

In Group I, three animals died in the early postoperative period after the initial surgical preparation. One animal died of haemorrhage in the operating room secondary to anastomotic failure between SVC and the 20 mm Gore-tex<sup>®</sup> conduit. Technical difficulties of thoracotomy exposure and end-to-side SVC to Gore-tex<sup>®</sup> conduit diameter mismatch were some problems encountered. The second animal died from a SVC syndrome secondary to haemodynamically significant stenosis at the level of Gore-tex<sup>®</sup> conduit to RA anastomosis due to stretched pectinate muscle bands. The third animal died of a large haemothorax

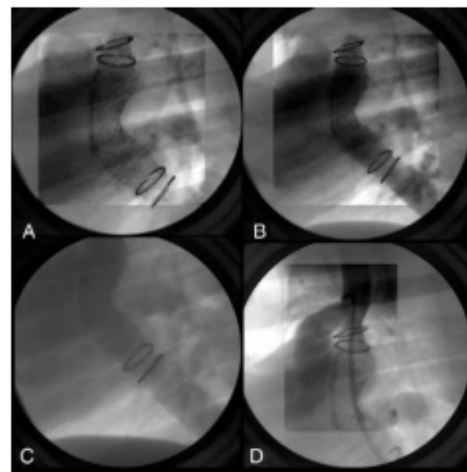
secondary to laceration of an intercostal artery while closing the thorax. Over time and after a short learning curve the procedure was standardized with no further complications noted in this group. Group II showed no mortality and the Gore-tex<sup>®</sup> conduit was anastomosed easily with the SVC and IVC.

#### Late results of initial surgery and interim period

In Group I, one animal died 4 months after the surgical preparation at the sheepfold secondary to pyothorax. Finally, six sheep survived the operative procedure and recovered uneventfully. One animal was considered as a control of this step and autopsied 12 months later to study the isolated effects of surgery without transcatheter instrumentation. There was no thrombus in the distal or proximal SVC stump; the Gore-tex<sup>®</sup> conduit between SVC and RA was widely patent with neo-endothelialization as expected; there was no displacement of nitinol rings with no evidence of transmural erosion. In Group II, all six animals survived the initial surgical procedure; however, one underwent early totalization in view of recurrent pneumothoraces.

#### Early results after transcatheter completion of intracardiac cavocaval connection

Among the remaining five animals in Group I, all underwent transcatheter completion after a median interim period of 9 months (range 1–9 months). The three to four covered stents were precisely deployed between the two nitinol rings with no compromise or covering of the of the SVC–RA conduit ostium, a surrogate for the RA–PA anastomosis as in a classic Fontan (Fig. 3).



**Figure 3:** Angiograms after transcatheter cavocaval connection in Group I. (A) Covered stents have been placed between SVC and IVC rings. (B) Dye injection in the pathway. (C) Still frame focusing on the IVC junction. The dye is diverted within the intracardiac pathway. (D) Angiogram showing the SVC connection with the RA.

### Early results after transcatheter completion of extracardiac cavocaval connection

All six sheep in Group II underwent perforation of the PTFE membranes, opening of the Gore-tex® conduit and closing the native ostium of the IVC to simulate an extracardiac Fontan-like circulation after a median interim period of 1 month (range 0-1) (Figs 4 and 5). A single covered stent was required to effectively occlude the native ostium of the IVC and channelize flow into the conduit.

All animals in both groups demonstrated good flow dynamics in the SVC-RA conduit; no gradients or shunts were noted between IVC, SVC and RA. All left the cardiac catheterization laboratory alive with no complications. Only one animal in Group I showed a moderate gradient (3 mmHg) at the level of the Gore-tex® conduit-RA anastomosis secondary to uncut and stretched pectinate muscles.

### Outcomes at last follow-up after transcatheter completion

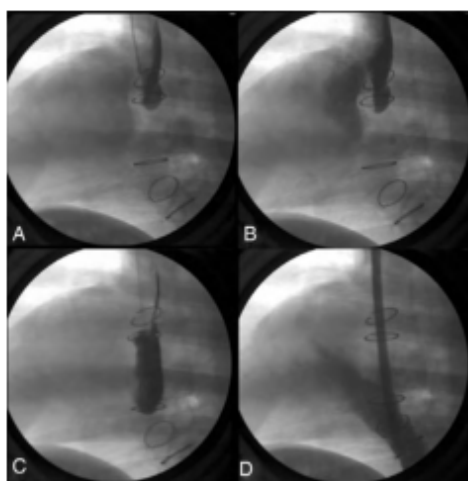
In Group I, all animals were followed for a median follow-up of 5 months (range 1-8 months) before sacrifice. No late technical, haemodynamic or thrombotic complications were noted. The concluding angiograms did not show any stent migration, *in situ* thrombus or leakage across the device. The gross examination showed proximal and distal stents well anchored by the nitinol rings with no displacement.

In Group II, four animals were followed for a median follow-up of 3 months before the sacrifice. No technical, haemodynamic or thrombotic complication was noted in any animal. The concluding

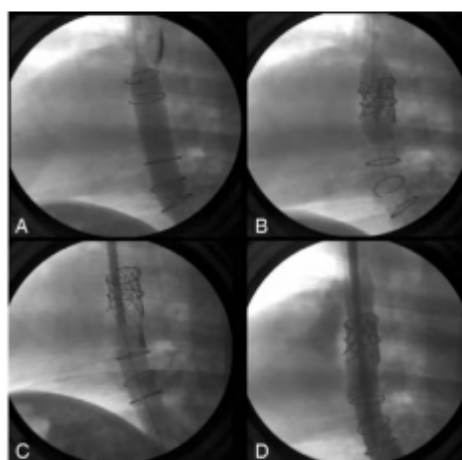
angiograms showed a widely patent extracardiac conduit, without any gradients at any level. The covered stent was well deployed with no IVC to RA leakage. The gross examination showed a well neo-endothelialized extracardiac Gore-tex® conduit and complete disruption of the PTFE membrane. The PTFE strands were seen below the stent or against the prosthetic wall. The stents were securely moulded on the nitinol anchoring rings and Gore-tex® conduit.

### DISCUSSION

Transcatheter completion of Fontan circulation marks a new milestone in the management of patients with univentricular heart. The distinct advantage of eliminating a second prolonged surgical procedure and thus avoiding possible surgical morbidity and mortality is the key impetus for this procedure. The study by Alsoufi *et al.* [10] appears quite promising due to the short recovery, low complications and excellent early results. Nonetheless, there are several potential disadvantages in their approach or in the other techniques attempted so far [13-16]. The initial surgical procedure must be well planned with the interventional cardiologist to allow transcatheter completion with long-term functionality of Fontan circulation. The lack of such an ideal surgical animal preparation to try and test various transcatheter techniques prompted us to do this study. In Group I animals from the current study, the surgical preparation was simple and reproducible, with a short learning curve without the use of extracorporeal cardiac circulation. Transcatheter completion of intracardiac cavocaval connection was performed without complications. The property of foreshortening of the covered stent on balloon expansion must be kept in mind to ensure complete freedom of the SVC-PA anastomotic ostium. In



**Figure 4:** Angiograms at various steps of the cavocaval connection in an animal from Group II. (A) Initial angiogram showing the position of the nitinol rings and the occluding SVC membrane. (B) Dye contrast going through the SVC connection with the RA. (C) Dye injection in the Gore-tex extracardiac conduit after puncture of the SVC membrane. (D) Dye injection in the IVC after opening of the IVC occluding membrane showing the connection of the IVC with the RA.



**Figure 5:** Angiograms at various steps of the cavocaval connection in an animal from Group II. (A) Angiogram showing balloon dilation of PTFE membrane. (B) Insertion of the CP stent at the level of the occluding SVC membrane. (C) Insertion of a covered stent (atrium) covering both the IVC membrane and the connection of IVC-RA. (D) Angiogram at final stage showing redirection of the flow within the extracardiac conduit.



view of the cited advantages of an extracardiac Fontan, we developed a chronic animal model to reproduce an extracardiac cavocaval connection. This technique may be used as an extension of the initial cavopulmonary shunt in humans. The surgical simulation of extracardiac preparation in our ovine model was simple and successful without the use of cardioplegia. Transcatheter completion of extracardiac cavocaval connection was smooth, without complications or revisions. We believe the long-term results with respect to hemodynamic flow, arrhythmia and thrombus formation may be similar to the conventional surgical extracardiac Fontan completion albeit the surgical morbidity and mortality and the prolonged post-surgical convalescence period. These encouraging results may however need additional refinements before use in humans.

## LIMITATIONS

None of the animals had a true univentricular heart; the study evaluates the adequacy of transcatheter techniques to establish a cavocaval connection in principle to achieve Fontan completion. With a fully functional RV, tricuspid and pulmonary valves with pulsatile flow, thrombus formation was not anticipated. The absence of atrial septal defect also eliminated the risk of paradoxical embolization unlike true univentricular hearts where the risk may be high with instrumentation. A strong and unified approach with the surgical team for the creation of a pathway to connect the roof of the RA to the underside of the RPA by a prosthetic device is of paramount importance. There may be a learning curve and thus an anticipated increase in surgical time/morbidity in the initial phase. Extreme care must be exercised by the surgeon when working close to the SVC-RA junction; the sinus node should ideally be located to avoid permanent damage and thus the need for life-long pacing. The long-term effects of stasis and stagnation of serum saline in the extracardiac conduit are unknown. The questionable loss of kinetic energy at the level of the new channel, possible late leakages at the anastomosis line and in-situ thrombus formation in view of the large area of foreign material in the RA are some additional concerns.

## CONCLUSIONS

Transcatheter techniques for completion of cavocaval connection in surgically simulated, chronic animal models are safe and feasible. Both techniques were equally successful with no failures or short-term complications. Such techniques should work in principle for the completion of intracardiac and extracardiac Fontan circulation and mark a new milestone in the management of patients with univentricular hearts. In view of better long-term outcomes reported with extracardiac Fontan, transcatheter completion of extracardiac cavocaval connection deserves special attention. With growing experience it may be possible to create a hybrid strategy and concomitant intraoperative completion of Fontan in the same setting with significant

reduction of cross-clamp time and perioperative mortality. Further long-term follow-ups may be required before the clinical application of such techniques.

## Funding

This work was supported by the Fondation de l'Avenir.

**Conflict of interest:** none declared.

## REFERENCES

- [1] Bacha EA, Marshall AC, McElhinney DB, del Nido PJ. Expanding the hybrid concept in congenital heart surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2007;10:146-50.
- [2] Alsoufi B, Bennetts J, Verma S, Caldarone CA. New developments in the treatment of hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics* 2007;119:109-17.
- [3] Galantowicz M, Cheatham JP, Phillips A, Cua CL, Hoffman TM, Hill SL et al. Hybrid approach for hypoplastic left heart syndrome: intermediate results after the learning curve. *Ann Thorac Surg* 2008;85:2063-70.
- [4] Galantowicz M, Cheatham JP. Fontan completion without surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2004;7:48-55.
- [5] Sidropoulos A, Ritter J, Schneider M, Konertz W. Fontan modification for subsequent non-surgical Fontan completion. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13:509-12.
- [6] De Vivie ER, Ruschewski W, Köveker G, Risch D, Weber H, Beuren AJ. Fontan procedure-indication and clinical results. *Thorac Cardiovasc Surg* 1981;29:348-54.
- [7] Jacobs ML, Norwood WJ Jr. Fontan operation: influence of modifications on morbidity and mortality. *Ann Thorac Surg* 1994;58:945-51.
- [8] Mitchell ME, Ittenbach RF, Gaynor JW, Wernovsky G, Nicolson S, Spray TL. Intermediate outcomes after the Fontan procedure in the current era. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;131:172-80.
- [9] Hausdorf G, Schneider M, Konertz W. Surgical preconditioning and completion of total cavopulmonary connection by interventional cardiac catheterization: a new concept. *Heart* 1996;75:403-9.
- [10] Alsoufi B, Alfadley F, Al-Omrani A, Awan A, Al-Ahmadi M, Al-Fayyadh M et al. Hybrid management strategy for percutaneous Fontan completion without surgery: early results. *Ann Thorac Surg* 2011;91:566-72.
- [11] Metton O, Calvaruso D, Stos B, Ben Ali W, Boudjemline Y. A new surgical technique for transcatheter Fontan completion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:81-6.
- [12] Konstantinov IE. Transcatheter completion of Fontan circulation: primam non nocere! *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:83-6.
- [13] Kilma U, Peters T, Peuster M, Hausdorf G, Haverich A. A novel technique for establishing total cavopulmonary connection: from surgical preconditioning to interventional completion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1007-9.
- [14] Cheatham JP, Galantowicz M, Torres W, Tower AJ, Hill SL, Kleinman CS et al. The use of custom-made covered NuMed CP stents in the treatment of congenital heart disease. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002;57:100.
- [15] Konstantinov IE, Meshkivili VV. Intracardiac covered stent for transcatheter completion of the total cavopulmonary connection: anatomical, physiological and technical considerations. *Scand Cardiovasc J* 2006;40:71-3.
- [16] Konstantinov IE, Benson LN, Caldarone CA, Li J, Shimizu M, Coles JG et al. A simple surgical technique for interventional transcatheter completion of the total cavopulmonary connection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:210-2.

## 3.4 Evaluation longitudinale expérimentale d'une totalisation de Fontan sur un modèle en croissance

### 3.4.1 Introduction

Dans l'article précédent [93], nous avons mis en avant le fait que la réalisation par voie percutanée d'une totalisation de Fontan extracardiaque percutanée, est fiable et reproductible. Le but de la présente étude, est d'analyser la faisabilité d'une totalisation de Fontan extracardiaque par voie percutanée sur des animaux en croissance afin de déterminer si nous pourrions l'envisager chez l'homme.

### 3.4.2 Méthodes

#### 3.4.2.1 Animaux

Vingt agneaux, d'un poids médian de  $20 \pm 2.5$  kg, ont été inclus dans l'étude et divisés en 2 groupes : 9 dans le groupe 1 (voie extracardiaque non circulante) et 11 dans le groupe 2 (voie extracardiaque circulante). Les expérimentations sur les animaux du groupe 1 ont toutes été effectuées avant celles sur le groupe 2.

#### 3.4.2.2 Préparation chirurgicale

La préparation chirurgicale a été effectuée sans circulation extracorporelle. Le cœur a été exposé grâce à une thoracotomie droite. Un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> a été interposé entre la VCS et la VCI. Aucun anticoagulant n'a été donné durant l'étude.

##### 3.4.2.2.1 Groupe 1

Les animaux du groupe 1 ont subi la pose d'une voie extracardiaque non circulante comme nous l'avons déjà décrit [93]. Brièvement, un tube en Gore-Tex<sup>®</sup> de 20 mm a été anastomosé, pour connecter la VCS et la VCI. L'extrémité de la VCI a été anastomosée de façon termino-latérale et l'extrémité de la VCS de façon termino-terminale. Les deux extrémités ont été occluses avec une membrane en PTFE. Des anneaux en nitinol ont été placés autour des connections supérieure et inférieure, au niveau des membranes en PTFE.

##### 3.4.2.2.2 Groupe 2

Chez les animaux du groupe 2, les connexions ont été modifiées pour créer une voie circulante. A l'extrémité de la VCI, une anastomose termino-terminale a été réalisée,

redirigeant tout le sang de la VCI dans le conduit. Un anneau en nitinol de 16 mm a été placé autour du conduit extracardiaque et de la VCI, juste au-dessous du niveau de l'anastomose. Dans la partie centrale, une large connexion entre le tube et l'AD (plus grande qu'une fenestration « classique ») est créée, au niveau du segment supérieur du conduit extracardiaque permettant de drainer le sang de la VCI. La VCS a été coupée et connectée à l'auricule de l'AD, de façon latéro-latérale. L'extrémité supérieure du conduit en Gore-Tex® a été occluse avec une membrane en PTFE puis connectée à la partie proximale de la VCS en interposant un conduit de Contegra d'environ 3 cm de long, monté sur un stent permettant de corriger la discongruence entre la VCS et le tube de Gore-Tex de 20 mm.

#### 3.4.2.3 Dérivation totale cavo-cave.

Entre 1 et 3 mois après la réalisation de la phase de pré conditionnement chirurgical (Poids médian  $40 \pm 5$  Kg), la procédure de totalisation a été réalisée en utilisant les deux artères fémorales et les veines jugulaires internes.

Dans le groupe 2, le stent utilisé à la jonction entre la VCS et le tube de Gore-Tex® servait de point de repère radiologique et permettait de réaliser une angioplastie efficace sur la zone anastomotique, au moment de la phase de totalisation. Un stent couvert était placé en regard de la zone de dérivation cavo-atriale. Des stents en métal nu additionnels étaient placés aux zones anastomotiques de la VCI ou supérieur, si besoin.

#### 3.4.2.4 Suivi

Dans le groupe 2, le premier animal n'a pas été converti, mais a été sacrifié après 2 mois, afin d'évaluer macroscopiquement l'intégrité du montage de pré-conditionnement chirurgical. Tous les animaux, excepté deux, ont été sacrifiés juste après la totalisation. Les 2 autres ont été sacrifiés, 3 mois après la totalisation.

### 3.4.3 Résultats et discussion

Tous les agneaux ont été pré-conditionnés avec succès. Seul un décès postopératoire est survenu dans le groupe 2.

Aucune totalisation n'a été réalisée dans le groupe 1 du fait d'une occlusion et compression des tubes de Gore-Tex.

Dans le groupe 2, l'autopsie avant totalisation de l'animal, a montré un chenal parfaitement perméable sans sténose ou thrombose. Les 9 autres animaux ont été totalisés par voie percutanée avec succès.

Nous avons initialement rapporté et testé une voie non circulante, en connectant un tube de Gore-Tex® occlus à la VCS et à la VCI chez des animaux adultes, chez lesquels la totalisation a été possible. Dans cette étude, nous voulions tester cette voie dans une population en croissance. Cependant, cela a échoué (groupe 1), par thrombose et compression du tube lors du processus de croissance. Nous avons par conséquent modifié notre approche (groupe 2), pour créer une voie circulante. Le conditionnement des animaux du groupe 2 était conçu pour mimer l'actuelle technique chirurgicale considérée comme gold standard, d'une dérivation cavo-pulmonaire extracardiaque totale. La technique utilisée était assez similaire à ce qui est fait dans la plupart des centres réalisant des connexions cavo-pulmonaires extracardiaques totales, après une connexion cavo-pulmonaire partielle. Des modifications mineures à la technique existante, ont été effectuées, pour permettre une totalisation par voie percutanée. Premièrement, nous avons interposé un conduit de Contegra de 14 mm monté sur un stent pour corriger la discongruence entre le tube Gore-Tex et la VCS. La large fenestration au segment supérieure, très proche de la membrane en PTFE, permettait un flux libre de la VCI vers l'AD, et le lavage complet du conduit par le sang de la VCI, sans risque de stase ni de thrombose. En utilisant cette nouvelle voie, les animaux étaient plus facilement convertis dans la plupart des cas.

#### 3.4.4 Implications cliniques

Nous pensons que notre modèle mime minutieusement l'étape nécessaire de pré-conditionnement chirurgical, pour être réalisable chez l'homme en intégrant les contraintes techniques et la problématique de croissance (nos animaux avaient en moyenne doublé leur poids). Le faible taux de complications et l'absence de décès spontané, lors de la période périopératoire et au cours du suivi, favorise la standardisation de cette technique. La survie uniforme en fait une technique bonne et reproductible, et offre également une plate-forme stable pour une totalisation percutanée ultérieure. Nous croyons que notre méthode de préparation chirurgicale, marque un nouveau virage pour le développement d'une approche hybride dans la prise en charge des cœur univentriculaires, tant en diminuant la morbi-mortalité, que la gestion même du passage d'une circulation en parallèle vers une circulation en série.

### 3.4.5 Limitations

Le manque de données sur les résultats à plus long terme, est une des limitations de cette étude. Cependant, la plateforme créée, avec la connexion de la VCS à l'AD ne modifie pas l'anatomie de l'animal et permet une survie à long terme. Bien sûr, ce modèle ne mime pas une circulation de Fontan, mais aucun modèle viable de circulation univentriculaire n'est actuellement disponible, pour tester chroniquement une circulation de Fontan. Toutefois, cela permet de tester toutes les étapes de création d'une totalisation de Fontan. De plus, les complications chroniques d'un tel procédé, peuvent être évaluées, du fait qu'il s'agit d'un modèle viable.

Les propriétés et diamètres des matériaux utilisés lors du pré-conditionnement chirurgical ont montré une bonne adaptabilité au phénomène de croissance. Cependant, nous n'avons pas attendu le poids adulte définitif des animaux, néanmoins nous avons testé les propriétés d'expansion du Contegra, in vivo et ex vivo, et il montre de bonnes propriétés d'accroissement (données non fournies) [94]. De plus, nous avons placé de larges conduits en Gore-Tex® (20 mm) et de larges stents (22mm), pour éviter le besoin de ré-expansion.

Malgré les très bons résultats expérimentaux, des questions demeurent avant de futures applications cliniques, comme quelle stratégie d'anticoagulation serait nécessaire, devrions-nous réaliser progressivement le passage d'une circulation en parallèle vers une circulation en série ?

### 3.4.6 Conclusion

Une façon innovante de pré-conditionnement chirurgical extracardiaque, sans circulation extracorporelle, sans anticoagulant, permettant une totalisation de Fontan par voie percutanée, a été décrite. Les résultats sont encourageants, une étude chronique avec recherche de microthrombi pulmonaires devrait être requise, avant d'envisager un passage en phase clinique.



Ce travail a été publié dans « Archives of Cardiovascular Diseases ». Ci-après une version de l'article est donnée.



Available online at  
**ScienceDirect**  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
**EM|consulte**  
www.em-consulte.com/en



CLINICAL RESEARCH

## Novel method of surgical preparation for transcatheter completion of Fontan circulation: Creation of an extracardiac pathway



Une méthode originale de préparation chirurgicale pour la réalisation d'une circulation de Fontan percutanée : création d'une voie extracardiaque

Younes Boudjemline<sup>a,b,\*</sup>, Sophie Malekzadeh-Milani<sup>a</sup>,  
Mathieu Van Steenberghe<sup>a</sup>, Yann Bögli<sup>a</sup>, Mehul Patel<sup>a</sup>,  
Regis Gaudin<sup>a</sup>, Damien Bonnet<sup>a,b</sup>, Sébastien Gerelli<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Pediatric cardiology, centre de référence des malformations cardiaques congénitales complexes–M3C, Necker hospital for sick children, Assistance publique des Hôpitaux de Paris, 149, rue de Sévres, 75015 Paris cedex, France

<sup>b</sup> Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Received 21 March 2014; received in revised form 29 April 2014; accepted 6 May 2014  
Available online 24 June 2014

### KEYWORDS

Congenital heart defect;  
Fontan circulation;  
Transcatheter technique;  
Hybrid approaches

### Summary

**Background.** – The alliance between surgeons and interventionists has inspired creative techniques to surgically precondition the heart for subsequent transcatheter repair. The interest stems from the need to avoid repeated surgeries. Transcatheter Fontan completion of intracardiac pathway has been reported.

**Aim.** – To report a new surgical preparation for transcatheter completion of extracardiac Fontan circulation.

**Methods.** – The inferior vena cava (IVC) was cut and anastomosed end-to-end with the inferior end of a Gore-Tex conduit in 20 lambs. A ring was placed around the IVC near the anastomosis. The superior vena cava was cut and connected with the right atrium (RA) auricle. In group 1

Abbreviations: IVC, inferior vena cava; PTFE, polytetrafluoroethylene; RA, right atrium; RAA, right atrial appendage; SVC, superior vena cava.

\* Corresponding author at: Hôpital Necker Enfants Malades, Cardiologie Pédiatrique, 149, rue de Sévres, 75015 Paris Cedex, France.

E-mail address: younes.boudjemline@nck.aphp.fr (Y. Boudjemline).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.acvd.2014.05.003>

1875-2136/© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

( $n = 9$ ), the Gore-Tex conduit was occluded at both ends by a polytetrafluoroethylene membrane. In group 2 ( $n = 11$ ), the upper segment of the Gore-Tex tube was opened and connected to the RA to allow free flow of IVC blood. Fontan completion was attempted 1–3 months following surgery. Animals were sacrificed just after or 3 months after completion.

**Results.** – All lambs were successfully preconditioned. We failed to complete the pathway in all animals from group 1 – autopsy showed occlusion of the pathway. In group 2, there was one postoperative death, one elective sacrifice after 2 months to assess pathway integrity, and nine successful completions. Autopsies showed widely patent pathway and well-deployed covered stents completely occluding the fenestrations.

**Conclusions.** – Circulating extracardiac conduit offers the best option to prepare for extracardiac Fontan completion. This surgical preparation opens new frontiers for transcatheter and hybrid techniques for extracardiac Fontan completion.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

#### MOTS CLÉS

Cardiopathies congénitales ;  
Circulation de Fontan ;  
Techniques percutanées ;  
Approches hybrides

#### Résumé

**Contexte.** – La réalisation de Fontan percutanée a été décrite dans la littérature.

**Objectif.** – Rapporter la création d'un modèle pour la réalisation d'une circulation extracardiac de Fontan par voie percutanée.

**Méthodes.** – La veine cave inférieure de 20 animaux a été anastomosée avec l'extrémité inférieure d'un conduit de Gore-Tex. La veine cave supérieure a été coupée et reliée à l'auricule droite. Chez neuf agneaux (groupe 1), le conduit de Gore-Tex a été occlus aux deux extrémités. Dans le groupe 2, le tube de Gore-Tex a été largement fenêtré pour permettre la circulation du sang cave inférieur sans contrainte. L'extrémité supérieure était fermée. La totalisation du Fontan a été réalisée un à trois mois après la chirurgie. Les animaux ont été sacrifiés juste après et 3 mois après la totalisation.

**Résultats.** – Tous les agneaux ont été pré-conditionnés avec succès avec un décès postopératoire (groupe 2). Aucune totalisation n'a été possible dans le groupe 1. L'autopsie a montré une occlusion complète des conduits extracardiaques. Dans le groupe 2, un animal a été sacrifié électivement après 2 mois pour évaluer l'intégrité du conduit extracardiaque. Les 9 autres ont eu leur totalisation percutanée avec succès. À l'autopsie, les conduits étaient largement ouverts; les stents couverts étaient parfaitement déployés, occluant le passage conduit-oreillette droit.

**Conclusions.** – Le conduit extracardiaque circulant offre la meilleure option pour préparer à une totalisation percutanée d'un Fontan extracardiaque. Cette préparation chirurgicale ouvre de nouvelles perspectives pour des techniques percutanées et hybrides de totalisation de circulation de Fontan.

© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

## Background

Children with functionally univentricular hearts face remarkable struggles throughout their lives. The development of the classic Fontan operation has significantly improved their long-term survival, but repeated surgeries impact on survival and quality of life. The incidence of atrial arrhythmias secondary to atrial scarring after classic Fontan ranges from 4% to 35% at 5-year follow-up, and up to 40% at 10-year follow-up [1]. Atrial arrhythmia may lead to reduced cardiac output and left ventricular dysfunction, both of which may detrimentally affect Fontan physiology. Extracardiac Fontan surgery deserves special attention as it reduces atrial scarring and thereby, the incidence of atrial arrhythmia. Furthermore, the incidences of obstruction of the cavopulmonary pathway, reoperation, thromboembolism and late death is reported low with extracardiac Fontan circulation [2].

The alliance between surgeons and interventional cardiologists during hybrid procedures has inspired some highly creative techniques to surgically precondition the heart for subsequent transcatheter repair. The interest for such procedures stems from the need to avoid repeated surgeries and accomplish Fontan completion with minimal invasion. The attributes of ideal surgical preparation for transcatheter completion of Fontan circulation include:

- achievement of a safe and viable preparation without the use of extracorporeal circulation and cardiac arrest;
- a minimal quantity of foreign material left in the systemic atrium;
- no interference with sinus rhythm;
- limited atrial scarring;
- the use of conduits of sufficient diameter to accommodate future cardiac growth and thus avoid surgical redo;
- most importantly, safe completion of Fontan circulation using transcatheter techniques.

Keeping these attributes in mind, we have developed new techniques of surgical preparation for further transcatheter completion. We have previously reported the creation of a model that mimics a Fontan circulation, thus allowing surgical conditioning and transcatheter completion to be tested [3]. Both intracardiac and extracardiac pathways were tested in ewes [3,4]. The extracardiac pathway initially consisted of a non-circulant pathway—an occluded Gore-Tex filled with saline was connected to create the Fontan-like circulation in a model of fully grown ewes. The aim was to test the non-circulant extracardiac pathway and a new circulating pathway in growing animals. In order to try to improve the pathway and see if the good results were sustained in a growing animal model of Fontan, we report here the evolution of a previously published extracardiac pathway in a population (growing animals) more closely related to clinical practice.

## Methods

### Animals

Twenty lambs weighing  $20 \pm 2.5$  kg were included and divided into two groups: nine in group 1 (non-circulant extracardiac pathway) and 11 in group 2 (circulant extracardiac pathway). Experiments on all animals in group 1 were completed prior to those on animals in group 2. All animals received humane care in compliance with the standards of European Convention on Animal Care. The study was approved by the local institutional ethics committee (INRA, Paris, France). Qualified personnel supervised the procedures and adequate anaesthesia using inhaled isoflurane (1–5%) was used to minimize unnecessary pain.

### Surgical preparation

Animals underwent endotracheal intubation and mechanical ventilation under sedation. Surgical preparation was performed without extracorporeal circulation using temporary vascular clamping. The heart was exposed through a right thoracotomy. A Gore-Tex conduit was interposed between the superior vena cava (SVC) and the inferior vena cava (IVC). No anticoagulation was given to animals during the study.

#### Group 1 (non-circulant)

Animals in group 1 underwent the non-circulant extracardiac pathway surgical technique (Fig. 1) as has been previously reported [4]. Briefly, a 20-mm Gore-tex conduit—de-aired and filled with heparinized saline—was anastomosed to connect the SVC and the IVC. The IVC end was anastomosed in a termino-lateral fashion and the SVC end in a termino-terminal fashion; both ends were occluded with a polytetrafluoroethylene (PTFE) membrane. Due to the latero-terminal connection of the IVC, the blood from the IVC could flow freely to the right atrium (RA) as normal. Metallic rings were placed around the superior and inferior connections at the level of the occluding membranes (Fig. 1B).

#### Group 2 (circulant)

In animals in group 2, the connections were modified to create a circulant pathway (Figs. 2 and 3). At the IVC end, an end-to-end anastomosis was performed that directed all blood from the IVC into the conduit. A nitinol wire was used to create an open ring of diameter 16 mm. Using the property of memory alloy, after straightening and release of constraint, the wire regained its ring configuration. This ring was straightened, placed and fixed around the extracardiac conduit and the IVC just below the level of the anastomosis. In the middle section, a large connection (larger than "classical" fenestration) was created at the upper segment of the extracardiac Gore-Tex conduit. This was connected laterally to a similarly large opening in the RA to allow free flow and washout of the conduit by IVC blood. The SVC was cut and connected to the RA auricle in an end-to-end fashion. The upper end of the Gore-Tex conduit was occluded with a PTFE membrane. A venous segment harvested from a small Contegra conduit (Medtronic Inc., MN, USA) was connected between the Gore-Tex conduit and the SVC to reduce the diameter and allow a smooth connection with the SVC. An end-to-side anastomosis was performed between the venous segment and the SVC. A short stent (CP, Numed, NY, USA; 2 rows) was placed around or inside the venous segment as reported previously [4]. The stent was secured with single stitches before suturing to the SVC. The chest was then closed and lambs were sent to the farm to recover and heal for subsequent transcatheter Fontan completion.

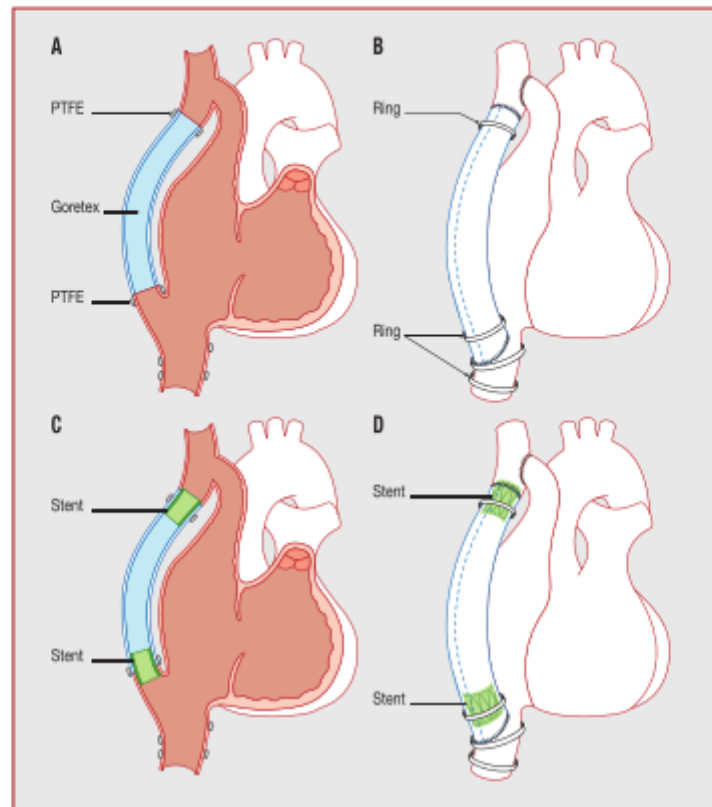
### Interventional catheter completion

At 1–3 months after surgical preparation, cardiac catheterization was performed using both right femoral and internal jugular veins (8Fr). Using fluoroscopic guidance, a 7Fr long Mullins sheath (Cook, IN, USA) was placed from the right common femoral vein in the conduit. A paediatric transseptal needle was advanced into the Mullins sheath and positioned in contact with the membrane separating the conduit and the SVC by tilting the needle clockwise. The position was verified in two planes.

In group 1, we expected to advance a wire in the non-circulant conduit to get contact with the inferior IVC membrane after puncturing the superior SVC membrane. The second membrane would then be perforated and vascular stents would be placed as reported previously [4].

In group 2, the stent used in the interposed venous segment served as an important radiological landmark to position the needle. When in position, the needle was pushed through the membrane. A 0.014" wire was then passed through the lumen of the needle and snared from the neck. Following the perforation of the membrane, balloons of increasing diameters were inflated at the level of the stent until complete disappearance of the waist. A 14-Fr sheath was advanced over a stiff guide wire into the IVC. A covered stent graft (CP covered, Numed Inc.) mounted on 22-mm BIB catheter (Numed Inc.) was placed to cover and exclude the opening of the conduit with the RA (i.e. large fenestration). Additional bare metal stents (uncovered CP stent, Numed Inc.) were placed at the SVC and IVC connections when required.





**Figure 1.** Non-circulant extracardiac pathway (group 1) surgical technique. (A) Internal and (B) external views showing the Gore-Tex anastomosis between the IVC and SVC ends; both ends were occluded with a PTFE membrane; rings were placed around the two connections at the level of the occluding membranes. (C) Internal and (D) external views after transcatheter completion; stents were inserted after perforation of the membrane; the inferior stent ran from the inferior membrane to the native IVC to redirect the blood in the Gore-Tex conduit. IVC: inferior vena cava; PTFE: polytetrafluoroethylene; SVC: superior vena cava.

Selective angiographies (Figs. 4 and 5) were performed at subsequent steps:

- initially, to confirm the competence of the occluding membrane;
- the patency of the SVC–RA connection;
- the patency of the fenestration;
- after re-establishment of the pathway between the SVC and the extracardiac conduit to confirm opening of the membrane;
- after placement of covered stents to confirm sealing of the covered stents.

#### Sacrifice

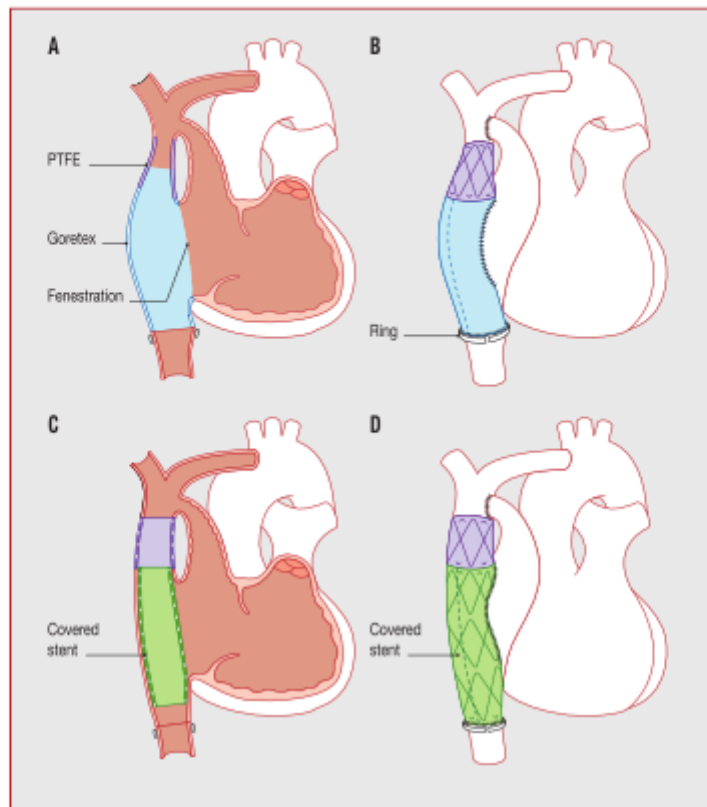
As per the study protocol, animals were planned to be converted 3 months after surgical preparation. However, following the results from group 1, the plan was modified. In group 2, the first animal was not converted, but was

sacrificed after 2 months in order to macroscopically assess the integrity of the pathway. All animals except two were sacrificed just after the completion. The other two animals were planned to be electively sacrificed 3 months after completion.

## Results

### Group 1 (non-circulant)

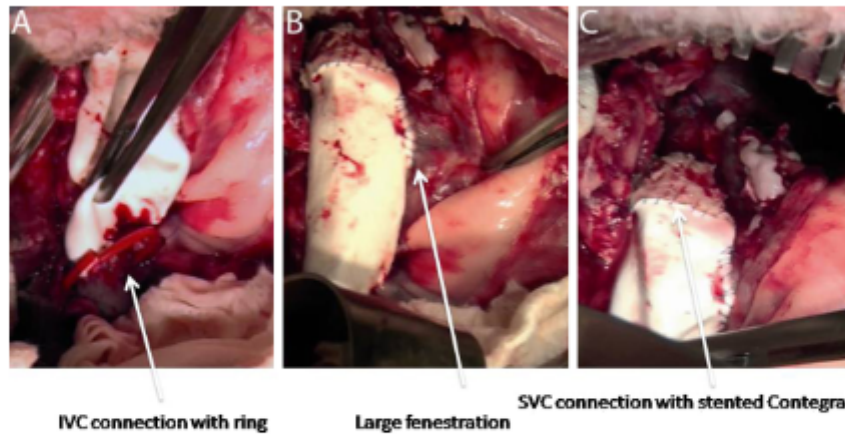
Group 1 results are summarized in Table 1. All nine animals were successfully preconditioned; and no animals died in the interstage period separating surgical preparation and completion. Nine animals were brought to the cardiac catheterization laboratory for completion of their pathway 1 to 3 months following surgery (mean 2.5 months). Perforation of the SVC membrane was successfully achieved in



**Figure 2.** Circulant extracardiac pathway (group 2) surgical technique. (A) Internal and (B) external views showing the IVC with an RA rim connected to the Gore-Tex conduit in an end-to-end anastomosis fashion. (C) Internal and (D) external views after transcatheter completion; the superior membrane was perforated and a stent placed to cover the large fenestration. The IVC blood then flowed through the pathway. IVC: inferior vena cava; RA: right atrium.

Table 1	Schematic summary of the study.	
	Group 1: non-circulant extracardiac pathway (n = 9)	Group 2: circulant extracardiac pathway (n = 11)
Step 1: surgical preparation	Successful in 9/9	Successful in 11/11; 1 postoperative death
Step 2: transcatheter completion	Mean 2.5 months after step 1; successful in 0/9	Mean 2.2 months after step 1; attempted and successful in 9/9 surviving animals <sup>a</sup>
Step 3: sacrifice	At the time of completion in 9/9; complete occlusion of the Gore-Tex conduit	Before completion and 2 months after step 1 (n = 1) At the time of completion (n = 7) After 3 months (n = 2)

<sup>a</sup> Of the 11 animals, one died after the surgical preparation and one was sacrificed prior to transcatheter completion to check the integrity of the created pathway.



**Figure 3.** Operative views of the circulant extracardiac pathway (group 2). (A) The inferior connection showing the IVC connected to a Gore-Tex conduit with end-to-end anastomosis. (B) The extracardiac conduit connected to the lateral side of the RA via a very large fenestration that allowed complete washout of the conduit by the IVC. (C) Superiorly, a stented venous segment has been interposed between the conduit and the target vessel (SVC in our model and pulmonary artery in humans) to allow for a smooth reduction of the diameter from conduit size to vessel size. IVC: inferior vena cava; SVC: superior vena cava; RA: right atrium.

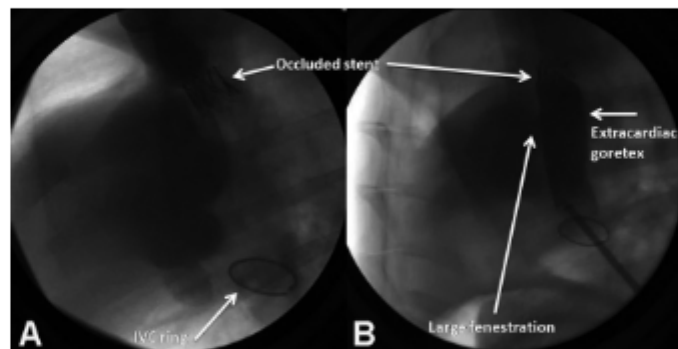
all animals, but we failed to create the expected pathway because the non-circulant Gore-Tex conduit was completely occluded from one end to the other. At autopsy, the conduit was filled with a compact fibrous tissue, which explained why the pathway could not be completed (Fig. 6).

#### Group 2 (circulant)

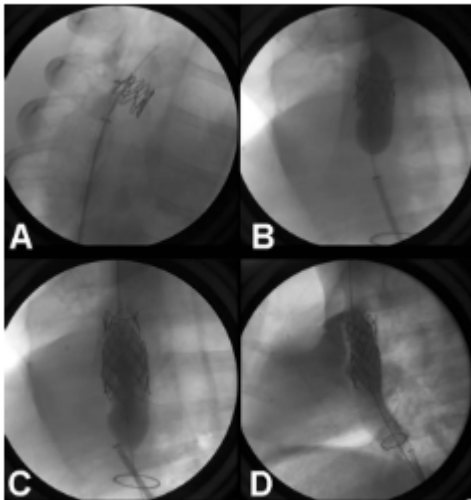
Group 2 results are summarized in Table 1.

#### Preconditioning

All 11 animals were successfully preconditioned. One animal died postoperatively secondary to an occlusion of the SVC–RA connection. At autopsy, the anastomosis was occluded by pectinate muscles with a large amount of blood exsanguinated in the thoracic cavity. The remaining animals showed uneventful recovery. As planned, the first surviving animal was sacrificed 2 months after surgery without undergoing completion to look for the integrity of the created pathway.



**Figure 4.** Angiographic views showing the pathway prior to transcatheter completion. (A) Superior injection showing the stented venous segment and the connection of the SVC with the right auricle. (B) Dye injection in the IVC showing the ring around the IVC, the direct connection with the extracardiac conduit and the large opening into the RA. The occluding membrane located at the interface between the conduit and the stented venous segment explains the absence of contrast at this level (group 2). IVC: inferior vena cava; RA: right atrium.



**Figure 5.** Angiographic views showing the steps to perform the completion and the final pathway created after completion in animals in group 2. (A) Still frame showing a trans-septal needle perforating the occluding membrane. (B) Balloon dilatation of the stented venous segment. (C) Placement of a covered stent to exclude the fenestration. (D) Final result after completion.

Cardiac catheterization prior to sacrifice showed patent extracardiac pathway, patent conduit–RA opening, complete occlusion of the conduit–SVC connection and a patent SVC–RA connection. Haemodynamics showed no gradient between the conduit and the RA but a mean gradient of 2 mmHg between the SVC and the RA. At *ex vivo* examination, the IVC anastomosis was widely patent and the PTFE membrane was covered by fibrous tissue. The

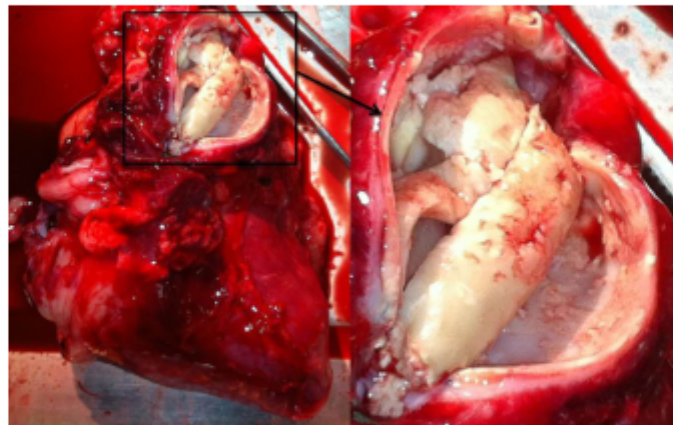
SVC–RA anastomosis was patent but partially occluded by uncut pectinate muscles.

#### Assessment before completion

The remaining nine animals were brought to the cardiac catheterization laboratory for completion of their pathway at 1–3 months following surgery (mean 2.2 months; median 3 months). Angiographies showed free patent pathways in all animals except one. One animal had a stenosis at the level of the IVC anastomosis with a mean gradient of 2 mmHg. The fenestration was widely patent in all. The SVC–RA anastomosis was patent but partially stenosed in 3/9 animals with minimal gradient (0–2 mmHg; mean 1 mmHg). The PTFE membrane was still occlusive and pliable. In one animal, the gap between the SVC and the conduit was particularly long with an occluded segment of around 1 cm.

#### Completion

Perforation of the membrane was easily performed using a trans-septal needle placed from below in 8/9 animals. In the remaining animal (the one with the long occluded segment), it required multiple attempts before successful perforation. A mean of two balloon dilatations was required in all animals to completely open the conduit–SVC segment. In the animal with the long occlusion, a stent was required. Closure of fenestration was easily performed using covered stents. The animal with the stenosis of the IVC–conduit anastomosis required the placement of a stent in this region. This stent was easily placed and perfectly anchored partially within the conduit and maintained partially by the ring placed around the IVC during the previous surgery. There was no stent dislodgement or embolization noted in any animal. Haemodynamic assessment showed no gradient between the IVC, the conduit and the SVC. However, a significant SVC–right atrial appendage (RAA) gradient was noted in most animals (2–6 mmHg; mean 4 mmHg). This gradient increased after Fontan completion as the entire cardiac out-



**Figure 6.** Autopsic picture of non-circulant pathway (group 1) showing complete occlusion of the Gore-Tex conduit by dense, compact fibrous tissue.



put except for the coronary sinus blood was now passing through this relatively small SVC–RAA connection.

According to the protocol, two animals were sacrificed 3 months after Fontan completion. Haemodynamics were unchanged in these animals showing a mean gradient of 2 mmHg at the level of the SVC–RAA connection. At autopsy, the IVC was largely patent. The connection of the SVC with the RAA was partially occluded by uncut pectinate muscles. Covered stents were well-deployed with good apposition and complete occlusion of fenestration (Fig. 7).

## Discussion

Despite its advent in the late 1990s, transcatheter techniques for Fontan completion are still considered largely experimental and are performed in selected few centres around the world. Moreover, the surgical technique to prepare the heart for transcatheter Fontan completion has seen multiple revisions since its introduction. New challenges surface at each change and the quest for an ideal surgical technique continues. Hausdorf et al. [5] were the first to attempt transcatheter completion of a hemi-Fontan with balloon dilatation of the banded cavo-atrial junction and fenestration closure using either a covered stent or occluders [6]. Subsequently, Klima et al. [7] developed a new approach by establishing bidirectional Glenn circulation and subtotal banding of the SVC at the cavo-atrial junction, along with PTFE cuff placement around the IVC; all performed in the absence of cardiopulmonary bypass. To facilitate placement of the graft stent in the SVC–RA junction, Galantowicz et al. [8] and Cheatham et al. [9] closed the SVC–RA junction by a pericardial patch for a subsequent intracardiac stent. Konstantinov et al. modified this further by placing stents at the level of both atrio-caval junctions [10,11]. The atrial SVC was then connected to the inferior face of the unopened right pulmonary artery. We further modified this model by using a specially designed covered stent occluded in the centre by a PTFE membrane with excellent outcomes of transcatheter completion [12].

The use of extracorporeal circulation, cardiac arrest and the insertion of foreign material inside the heart with such techniques lead to significant atrial scarring and atrial arrhythmia in the long term. Atrial arrhythmia can reduce cardiac output and cause left ventricular dysfunction; both of which can prove highly detrimental for Fontan physiology. Extracardiac Fontan has minimal atrial scarring in contrast to the classic Fontan surgery. In lieu of such concerns and in the quest to create an ideal heart model, there is a compelling need to focus on new methods of surgical preparation with the creation of a unique pathway that would answer these questions.

We initially reported and tested a non-circulant pathway connecting an occluded Gore-Tex conduit to the SVC and IVC in adult animals, in which completion was possible. In this study, we wanted to test this pathway in a growing population but failed to complete the pathway as expected (group 1), showing the need for conduit washout. We therefore modified our approach (group 2) to create a circulating pathway (an evolution of the previous non-circulant pathway). The conditioning of animals from group 2 was designed to

mimic the actual surgical gold standard technique of extracardiac total cavopulmonary connection. The technique we used is quite similar to what is done in most centres performing surgical extracardiac total cavopulmonary connections after partial cavopulmonary connection. Minor modifications to the existing technique were made to allow transcatheter completion. Firstly, we integrated a rim of RA tissue to allow the use of a 16–22-mm conduit that is sufficient in size even for an adult. The insertion of a 16-mm conduit would have been easier in our model. Large fenestration at the upper segment very close to the occlusive PTFE membrane allowed free flow from the IVC to the RA and complete washout of the conduit by IVC blood with no stasis or stagnation and thus less chance of thrombus formation. A short, stented segment harvested from a Contegra conduit was used in our study to interpose between the Gore-Tex conduit and the small native SVC (pulmonary artery in humans) diameter to allow smooth transition. This could probably be tailored from the neighbouring native tissue in humans. Using this new pathway, animals were easily converted in most cases.

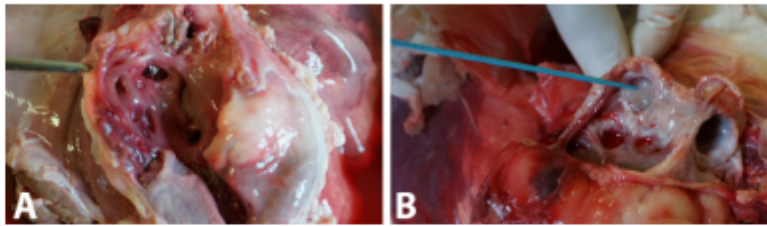
One should understand what modifications were made for the creation of the Fontan model and what represents the surgical preparation of the transcatheter Fontan completion. The superior connection of the SVC to the RA auricle is only done to allow chronic survival in the animal model. This step is, of course, unnecessary in humans and should be replaced by connection to the right pulmonary artery as is usually performed in extracardiac total cavopulmonary connection (Fig. 8). The experimental results after transcatheter completion appear very promising. Complications theoretically possible with intracardiac transcatheter Fontan – such as sinus node lesion, conduction disturbances or thrombus formation in the systemic atrium – are unlikely to occur in the presented extracardiac pathway.

## Clinical implications

We believe that our surgical preparation closely mimics the pre-Fontan preparatory stage of a univentricular heart from an interventional standpoint. The low rate of complications and no spontaneous deaths in the perioperative period and during follow-up favours the standardization of this technique for the creation of a chronic model for transcatheter completion of extracardiac Fontan completion. The uniform survival makes this a good, reproducible technique and also offers a stable platform for subsequent transcatheter completion. We believe that our method of surgical preparation marks a milestone for the further development of transcatheter and hybrid strategies to accomplish transcatheter completion of extracardiac Fontan in the same setting with a significant reduction in atrial scarring and intracardiac foreign material and, possibly, a reduced risk of stent failure [13,14].

## Limitations

The lack of long-term outcome data is one limitation of this study. However, the platform created with the connection of the SVC to the RA does not modify the anatomy of the animal and allows long-term survival. Of course, this model does not mimic a Fontan circulation, but no

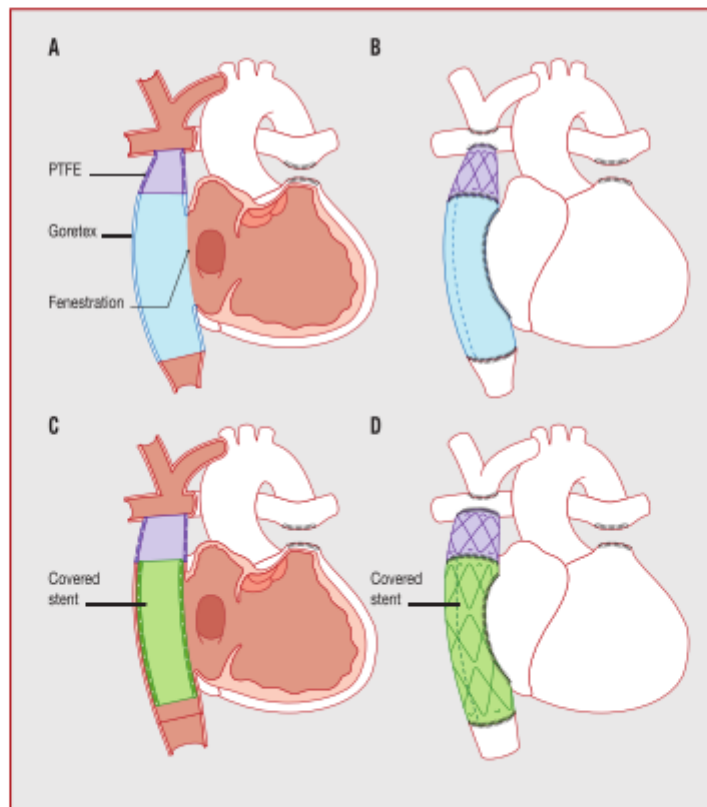


**Figure 7.** The fenestration is shown after sacrifice in (A) acute and (B) 3-month evaluations (group 2).

viable model of univentricular circulation is presently available to chronically test a Fontan circulation. However, it does allow testing of all the steps for a Fontan-like circulation from surgical preparation to transcatheter completion. Moreover, chronic complications (e.g. thrombus formation, stent fractures) of such procedures can be assessed as it is a viable model. The haemodynamics represent a

Fontan circulation and can reveal and describe – along with angiographies – complications such as stenosis of the anastomosis/stent or small and restrictive fenestration.

The properties of the interposed materials (Gore-Tex, stent, Contegra segment) may pose challenges in the future with regard to cardiac growth. However, we tested the expansion properties of Contegra material, in vivo and in



**Figure 8.** The circulant pathway as it would be done in humans. (A) Internal and (B) external views of the surgical preparation. (C) Internal and (D) external views after Fontan completion. PTFE: polytetrafluoroethylene.

vitro, and it showed good expansion properties (data not shown) [15]. Moreover, we interposed large Gore-Tex conduits and stents to avoid the need for re-expansion.

Despite very good experimental results, questions remain for future clinical applications, e.g. what anticoagulation strategy would be required? Moreover, like any innovative technique, clinical studies will be necessary to compare the present surgical staged strategy and a hybrid approach.

## Conclusions

An innovative way of surgical preparation using an off-pump surgical technique for subsequent transcatheter completion of extracardiac Fontan circulation is described. The surgical preparation opens new frontiers for transcatheter and hybrid techniques for completion of extracardiac Fontan circulation. Further long-term studies with a similar chronic heart model may be required before such techniques may be implemented clinically.

## Disclosure of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest concerning this article.

## Acknowledgements

The authors thank the Fondation de l'Avenir grant number ETO-584 for its financial support.

*Funding:* This work was supported by the Fondation de l'Avenir.

## References

- [1] Gelatt M, Hamilton RM, McCrindle BW, et al. Risk factors for atrial tachyarrhythmias after the Fontan operation. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1735–41.
- [2] Kim SJ, Kim WH, Lim HG, Lee JY. Outcome of 200 patients after an extracardiac Fontan procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008;136:108–16.
- [3] Gerelli S, Van Steenberghe M, Patel M, Van Aerschot I, Boudjemline Y. Feasibility of creating a novel animal heart model to test transcatheter techniques for a cavocaval connection that mimics a Fontan completion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;146:408–12.
- [4] Boudjemline Y, Gerelli S, Van Steenberghe M, Patel M, Malekzadeh-Milani S, Bonnet D. Feasibility of transcatheter techniques for intracardiac and extracardiac cavocaval connection in principle for Fontan completion in chronic animal models. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013;43:856–60.
- [5] Hausdorf G, Schneider M, Konertz W. Surgical preconditioning and completion of total cavopulmonary connection by interventional cardiac catheterisation: a new concept. *Heart* 1996;75:403–9.
- [6] Sidropoulos A, Ritter J, Schneider M, Konertz W. Fontan modification for subsequent non-surgical Fontan completion. *Eur J Cardiothorac Surg* 1998;13:309–12 [Discussion 12–23].
- [7] Klima U, Peters T, Peuster M, Hausdorf G, Haverich A. A novel technique for establishing total cavopulmonary connection: from surgical preconditioning to interventional completion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:1007–9.
- [8] Galantowicz M, Cheatham JP. Fontan completion without surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2004;7:48–55.
- [9] Cheatham JP, Galantowicz M, Torres W, Tower AJ, Hill SL, Kleinman CS. The use of custom-made covered NuMed CP stents in the treatment of congenital heart disease. *Catheter Cardiovasc Interv* 2002;57:100 [Abstract].
- [10] Konstantinov IE, Alexi-Meskishvili VV. Intracardiac covered stent for transcatheter completion of the total cavopulmonary connection: anatomical, physiological and technical considerations. *Scand Cardiovasc J* 2006;40:71–5.
- [11] Konstantinov IE, Benson LN, Caldarone CA, et al. A simple surgical technique for interventional transcatheter completion of the total cavopulmonary connection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005;129:210–2.
- [12] Metton O, Calvaruso D, Stos B, Ben Ali W, Boudjemline Y. A new surgical technique for transcatheter Fontan completion. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:81–5.
- [13] Hijazi ZM. Intraoperative Intervention (hybrid surgery) and Intervention in the Immediate perioperative period. *Catheter Cardiovasc Interv* 2003;60:99–100.
- [14] Bacha EA, Marshall AC, McElhinney DB, del Nido PJ. Expanding the hybrid concept in congenital heart surgery. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu* 2007;10:146–50.
- [15] Boudjemline Y, Laborde F, Pineau E, et al. Expandable right ventricular-to-pulmonary artery conduit: an animal study. *Pediatr Res* 2006;59:773–7.

## 3.5 Evaluation de la fonction mitochondriale et du stress oxydant au niveau de l'endocarde et de l'épicarde dans un cœur sain

### 3.5.1 Introduction

Une meilleure compréhension du métabolisme énergétique myocardique est indispensable, si l'on veut pouvoir interagir à ce niveau dans le but d'augmenter le rendement énergétique cellulaire du cœur [95, 96]. Le myocarde soumis à un stress répété, volumique, de pression ou ischémique va toujours dans un premier temps essayer de s'adapter avant de défaillir. Ce mécanisme adaptatif ou « mal adaptatif » si l'on est finaliste, passe obligatoirement par une adéquation énergétique qui incombe aux mitochondries. La capacité des mitochondries à s'adapter pour finalement être prises de cours face à un stress myocardique répété est encore mal compris.

Le cœur des mammifères présente des hétérogénéités structurelles inhérentes à sa fonction et l'embryogénèse. Le flux sanguin coronarien, sa matrice, le métabolisme, les propriétés électrophysiologiques et contractiles diffèrent entre les couches musculaires sous-endocardique (Endo) et sous-épicardique (Epi), justifié par l'augmentation du stress mécanique, et la prédisposition à l'ischémie des couches musculaires Endo [97-99].

Les mitochondries jouent un rôle majeur dans les dommages liés à l'ischémie-reperfusion, et sont impliquées à la fois dans la production et les dommages oxydatifs [100]. Ces organites cellulaires produisent 95% de l'énergie requise par les cardiomyocytes, pour maintenir les cycles permanents de contraction/relâchement, participent à la signalisation cellulaire redox et à l'apoptose/nécrose cellulaire impliquée dans les maladies cardiovasculaires [96].

Compte tenu de ce décalage fonctionnel entre les couches musculaires Epi et Endo, il était fondamental d'analyser comment la fonction mitochondriale s'adaptait à cette transmuralité myocardique avant d'envisager son adaptabilité face à un stress.

Les facteurs clés méritant d'être étudiés en parallèle des capacités oxydatives du muscle cardiaque, sont les productions d'espèce radicalaire ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) et de Monoxyde d'Azote (NO). Nous savons effectivement qu'un des reflets de l'activité mitochondriale, pouvant avoir des implications majeures sur le remodelage tissulaire ou la mort cellulaire, est la production de stress oxydant, fruit inhérent de tout métabolisme

oxydatif, que ce soit dans le muscle squelettique ou cardiaque [95, 100, 101]. Le NO module l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) et le fonctionnement du pore de transition de perméabilité mitochondriale (PTPm), son ouverture menant à la cascade apoptotique [45, 102, 103]. Le NO est produit par l'enzyme Oxyde Nitrique Synthase (NOS), qui catalyse la conversion de la L-arginine en L-citrulline et en NO [102]. La voie de signalisation du NO joue un rôle crucial dans la physiopathologie des phénomènes d'ischémie-reperfusion [104]. Il a été montré que la NOS est compartimentée dans les cardiomyocytes et est potentiellement partout dans la paroi du ventricule gauche [105, 106].

Les objectifs de cette étude étaient, pour la première fois, 1) de comparer les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale de l'Endo et de l'Epi, et du pore de transition de perméabilité, 2) de déterminer si les productions de ROS et de NO sont spécifiquement augmentées dans l'Endo.

### 3.5.2 Méthodes

#### 3.5.2.1 Prélèvement du cœur de rat

Les rats ont été anesthésiés puis une sternotomie a été réalisée. Le cœur encore battant a été prélevé, rincé, et le cœur, les ventricules ont été pesés. La paroi libre du ventricule gauche (VG) a été disséquée, et les échantillons myocardiques Endo et Epi ont été extraits. Les échantillons ont été immédiatement utilisés pour la mesure des fonctions mitochondriales et de la production d' $H_2O_2$ .

#### 3.5.2.2 Activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et couplage

L'activité de la CRM a été étudié dans des fibres disséquées puis perméabilisées par un processus de saponification permettant l'évaluation de la fonction mitochondriale globale dans des mitochondries intactes en position intracellulaire normale, préservant les interactions essentielles avec les autres organites [107]. Les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, ont été analysés plus spécifiquement en utilisant des substrats et des inhibiteurs spécifiques. Le couplage de la respiration mitochondriale entre l'oxydation et la phosphorylation (production d'ATP) a été estimé en déterminant le ratio entre la vitesse maximale de consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire et sa respiration basale.

### 3.5.2.3 Effet du NO sur la chaîne de respiration mitochondriale :

Pour évaluer l'effet du NO sur la CRM, la vitesse de respiration mitochondriale était analysée en présence du donneur de NO, MAHMA NONOate à des concentrations croissantes et une saturation en ADP.

### 3.5.2.4 Mesure de la production de NO

La préparation des tissus du VG a été réalisée comme décrit précédemment par Fink et al. [108]. Le tissu était congelé dans une seringue contenant 1 mL de KHB dans du nitrogène liquide, immédiatement après l'incubation, les échantillons étaient stockés à -80°C. La quantification de la concentration de nytrosyle Fe (DETC)<sup>2-</sup> dans le tissu a été effectuée par EPR à -180°C (Noxygen Science Transfer and Diagnostics, Elzach, Germany). La concentration de NO dans le VG est calculée à partir d'une courbe standard rapportant la concentration de NO à l'amplitude du signal de l'EPR.

### 3.5.2.5 Mesure de la production de peroxyde d'hydrogène dans des fibres perméabilisées

La production d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été mesurée dans des fibres perméabilisées (Endo et Epi) in vivo en réponse à l'addition séquentielle des substrats et de ses inhibiteurs selon la technique de Anderson et al. [109].

### 3.5.2.6 Mesure de la production anion superoxyde par le Dihydroethidium (DHE)

Une évaluation de la production in situ d'anion superoxyde dans l'Endo et l'Epi est effectuée. Le DHE produit une fluorescence rouge quand il est oxydé par l'anion superoxyde. L'émission de cette fluorescence est donc enregistrée, permettant de mesurer la production d'anion superoxyde.

### 3.5.2.7 Mesure quantitative de mitochondrie, reflété par l'activité de la citrate synthase

Nous avons évalué le contenu mitochondrial global dans les couches Endo et Epi, en mesurant l'activité de la citrate synthase [107].

### 3.5.2.8 Mesure de la sensibilité d'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale

Les fibres perméabilisées sans myosine ont été préparées comme décrit précédemment [45]. La mesure de la sensibilité d'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale est effectuée selon la technique de Picard et al. [110]. Nous avons mesuré la consommation de Ca<sup>2+</sup> mitochondriale, après l'addition d'une unique émission de Ca<sup>2+</sup> (20



nM). Nous contrôlons ensuite la diminution de la concentration de calcium extra-mitochondriale. La consommation progressive de calcium par la mitochondrie a été contrôlée jusqu'à ce que la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  mitochondrial causé par l'ouverture du PTPm soit observée. La capacité de rétention de calcium mitochondriale, qui est un indice fiable de la sensibilité du PTPm, a été calculée comme la quantité totale de  $\text{Ca}^{2+}$  absorbée par la mitochondrie, avant la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.5.3 Résultats et discussion

Les principaux résultats de cette étude sont d'avoir démontré une capacité oxydative diminuée de l'Endo par rapport à l'Epi, dans le ventricule gauche sain, avec une augmentation de la production de ROS, et de la production de NO dans l'endocarde. Fait notable, le couplage mitochondrial et l'ouverture du pore de transition de perméabilité sont similaires dans les deux couches du VG.

#### 3.5.3.1 Réduction des activités des complexes de la chaînes respiratoire mitochondriale dans le sous-endocarde

Malgré l'accumulation d'évidences quant à l'hétérogénéité myocardique du cœur sain, par rapport au flux sanguin, à la structure, au métabolisme, aux propriétés électrophysiologiques et contractiles, il existe peu de données examinant le gradient énergétique potentiel de la paroi du VG.

Il existe seulement deux études utilisant des fibres saponifiées, qui permettent l'évaluation de la fonction mitochondriale globale dans des mitochondries intactes. MacDonald et al. n'ont récemment observé aucune différence respiratoire transmurale dans le VG chez des rats sains [111].

Dans la présente étude, la capacité oxydative de l'Endo était significativement plus faible que la capacité de l'Epi quand on utilisait le glutamate/malate ou la succinate, supportant le fait que les activités des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale étaient diminuées. Ces résultats démontrent l'existence d'un gradient énergétique transmural dans la paroi du VG indépendamment de l'activité de la citrate synthase qui est similaire dans ces couches musculaires. L'étude en parallèle de la production de ROS et de NO, permet de nous orienter sur la pertinence de ses résultats et d'établir les premières hypothèses mécanistiques qui pourraient expliquer les phénomènes adaptatifs du muscle cardiaque soumis à un stress.

### 3.5.3.2 Augmentation de la production d'oxyde nitrique dans le sous-endocarde

Le NO est un radical libre avec une vie très courte dans les tissus. En condition physiologique, la détection de NO et sa quantification dans le tissu biologique sont difficiles [112]. Grâce, à l'EPR NO spin-trapping, il est possible d'évaluer la concentration de NO dans le tissu en conditions physiologiques, avec une haute spécificité et sensibilité [112].

Nous avons ainsi pu observer un niveau significativement supérieur de NO dans l'Endo par rapport à l'Epi. Nos données mettent pour la première fois en lumière, à notre connaissance, qu'un gradient de NO transmural existe à travers la paroi du VG à l'état basal. Brahmajothi et al. [106] ont montré une hétérogénéité dans l'expression des gradients de NOS dans la paroi du VG, avec NOS1 principalement localisé dans l'Endo et NOS3 dans l'Epi. Ainsi, ces résultats suggèrent que la compartimentalisation de l'expression de NOS, est associée avec un gradient transmural de NO à travers la paroi du VG.

La signification physiologique d'un tel gradient transmural de NO est encore mal connue, mais l'augmentation de la concentration de NO dans l'Endo pourrait participer à une contractilité et un flux sanguin plus élevés dans l'Endo par rapport à l'Epi, comme il l'a déjà été observé dans des cœurs de mammifères [106, 113]. En effet, il existe la preuve que la NOS1 possède un effet inotrope positif sur le cœur, et le NO pourrait augmenter le flux sanguin, aidant au maintien d'une concentration adéquate en oxygène dans l'Endo [103].

Une des hypothèses émises, serait que l'augmentation de NO dans l'Endo pourrait être en lien avec la diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans l'Endo. Ainsi, malgré un contenu mitochondrial global similaire à travers la paroi du VG, le gradient de NO observé pourrait être responsable de la diminution des activités de la chaîne respiratoire mitochondriale dans l'Endo par rapport à l'Epi. En effet, comme nous l'avons mis en évidence et d'autres avant nous, l'augmentation de dose de donneur de NO sur la capacité oxydative maximale des couches Endo et Epi diminuent la vitesse maximale respiratoire mitochondriale, par une inhibition directe réversible de la cytochrome c oxydase et par la production réactive d'espèces nitrates, menant à une S-nitrosation des complexes respiratoires [102, 114].

### 3.5.3.3 Augmentation de la production de ROS sous-endocardique

Les ROS incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde, l'hydroxyle et le composé hautement réactif le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Le  $H_2O_2$  résulte de l'action de la



superoxyde dismutase (SOD) sur l'anion superoxyde, pouvant donner naissance à des radicaux hydroxyles, et pouvant diminuer les vitesses de respiration mitochondriale [115]. Une augmentation du stress oxydatif a été mis en relation avec une dysfonction mitochondriale lors de l'ischémie-reperfusion [101].

Dans la présente étude, une surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associée à l'augmentation de l'anion superoxyde par son marquage à la DHE ont été observées dans l'Endo, témoignant d'une augmentation du stress oxydatif à ce niveau. Une telle augmentation de stress oxydatif pourrait être impliquée dans la diminution de la fonction mitochondriale. Cependant, la dysfonction mitochondriale elle-même, est également une source de production de ROS, et la diminution de la respiration mitochondriale pourrait être à l'origine de la surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de l'augmentation de la production d'anion superoxyde. Ainsi, la relation entre la production de ROS et la capacité oxydative mitochondriale demande à être étudiée afin de déterminer si elle est la conséquence ou la cause de gradient énergétique myocardique.

#### 3.5.3.4 Sensibilité du pore de transition de perméabilité mitochondriale similaire dans les couches Endo et Epi

Nous avons déterminé pour la première fois la sensibilité du pore de transition de perméabilité mitochondriale dans les couches Endo et Epi afin d'évaluer si la diminution de la fonction respiratoire des couches musculaires sous endocardiques pouvait être liées à une surproduction de ROS. En effet, le PTPm est un large canal ionique, majeur dans la membrane mitochondriale interne, ce qui induit une apoptose lors de l'ouverture [45]. En la présence d'une augmentation de la concentration de Ca<sup>2+</sup> mitochondriale, d'une augmentation de la concentration de ROS et d'une diminution de la concentration d'ATP, l'ouverture du PTPm se produit et mène à des dommages cellulaires précoces [45]. Or, lors de notre étude dans le myocarde sain de rat, l'ouverture du PTPm était constant à travers la paroi du ventricule gauche comme si la surproduction de ROS à ce niveau endocardique n'avait pas de conséquence sur la fonction respiratoire. Debkova et al. ont démontré que la production de NO, via une NOS mitochondriale (NOSmt) inhibe l'ouverture du PTPm [116]. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent l'effet du NO sur le PTPm demeurent incertains. Il a été suggéré que le NO agit directement sur le pore et impacte la production de ROS ou la S-nitrosylation de la membrane protéique, il devient de plus en plus clair que le NO est un médiateur important de la régulation nitroso-redox influent probablement sur le mitohormesis [45, 116]. [117]. Le NO interagit avec plusieurs sources importantes d'O<sup>2-</sup> dans les cardiomyocytes,

incluant la xanthine oxydoréductase et la NADPH oxydase [117, 118]. De récentes études ont démontré que la NOS1 inhibe la xanthine oxydoréductase dans le réticulum sarcoplasmique, et la NOS3 inhibe la NADPH oxydase dans la membrane cellulaire des myocytes [117, 118]. En outre, il existe de plus en plus de preuves que la NOS1 peut être une NOSmt qui est associée et couplée fonctionnellement avec le complexe I [116].

Ainsi, une production de NO plus élevée dans l'Endo pourrait finalement avoir un effet protecteur sur la fonction mitochondriale, permettant à la sensibilité du PTPm d'être constant à travers la paroi du VG. Des données récentes ont démontré que l'astragaloside IV prévenait l'ouverture du PTPm, en inactivant la GSK-3 $\beta$  à travers la voie de signalisation NO/GMPc/PKG, et réduisait la mort cellulaire causée par l'ischémie-reperfusion en augmentant la production de NO [119].

Pour résumer, nos données donnent un aperçu de la physiologie de la paroi du ventricule gauche sain. Le gradient transmural de NO, présent dans le ventricule gauche de rats sains, pourrait potentiellement participer à la contractilité et au flux sanguin plus élevés de l'endocarde. Cependant, devant l'augmentation de la concentration de NO de l'Endo, il a été montré une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et une augmentation de la production de ROS mitochondriale.

Ces effets n'apparaissent pas délétères car les interactions du NO avec les mitochondries au niveau de l'Endo pourraient dans le même temps annihiler l'ouverture du PTPm. Davantage d'études seront nécessaires afin de démontrer si un défaut d'expression transmurale du NO peut déstabiliser l'équilibre énergétique myocardique, et être responsable des pathologies, telles l'insuffisance cardiaque ou l'ischémie myocardique.



# Left Ventricular Transmural Gradient in Mitochondrial Respiration Is Associated with Increased Sub-Endocardium Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Productions

Michel Kindo<sup>1,2</sup>, Sébastien Gerelli<sup>1,2</sup>, Jamal Bouitbir<sup>1,3</sup>, Tam Hoang Minh<sup>1,2</sup>, Anne-Laure Charles<sup>1,2</sup>, Jean-Philippe Mazzucotelli<sup>2</sup>, Joffrey Zoll<sup>1,2</sup>, François Piquard<sup>1,2</sup> and Bernard Geny<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup> Equipe d'Accueil 3072, Faculté de Médecine, Institut de Physiologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>2</sup> Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pôle d'activité Médico-Chirurgicale Cardiovasculaire, Nouvel Hôpital Civil, CHRU de Strasbourg, Strasbourg, France, <sup>3</sup> Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Nouvel Hôpital Civil, CHRU de Strasbourg, Strasbourg, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Roberta A. Gottlieb,  
Cedars-Sinai Medical Center, USA

### Reviewed by:

Amadou K. S. Camara,  
Medical College of Wisconsin, USA  
Aleksandr Slotland,  
Cedars-Sinai Medical Center, USA

### \*Correspondence:

Bernard Geny  
Bernard.geny@chru-strasbourg.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Mitochondrial Research,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 10 May 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 17 August 2016

### Citation:

Kindo M, Gerelli S, Bouitbir J, Hoang Minh T, Charles A-L, Mazzucotelli J-P, Zoll J, Piquard F and Geny B (2016) Left Ventricular Transmural Gradient in Mitochondrial Respiration Is Associated with Increased Sub-Endocardium Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species Productions. *Front. Physiol.* 7:331. doi: 10.3389/fphys.2016.00331

**Objective:** Left ventricle (LV) transmural gradient in mitochondrial respiration has been recently reported. However, to date, the physiological mechanisms involved in the lower endocardium mitochondrial respiration chain capacity still remain to be determined. Since, nitric oxide (NO) synthase expression in the heart has spatial heterogeneity and might impair mitochondrial function, we investigated a potential association between LV transmural NO and mitochondrial function gradient.

**Methods:** Maximal oxidative capacity ( $V_{Max}$ ) and relative contributions of the respiratory chain complexes II, III, IV ( $V_{Succ}$ ) and IV ( $V_{TMFD}$ ), mitochondrial content (citrate synthase activity), coupling, NO (electron paramagnetic resonance), and reactive oxygen species (ROS) production ( $H_2O_2$  and dihydroethidium (DHE) staining) were determined in rat sub-endocardium (Endo) and sub-epicardium (Epi). Further, the effect of a direct NO donor (MAHMA NONOate) on maximal mitochondrial respiratory rates ( $V_{max}$ ) was determined.

**Results:** Mitochondrial respiratory chain activities were reduced in the Endo compared with the Epi ( $-16.92\%$ ;  $P = 0.04$  for  $V_{max}$  and  $-18.73\%$ ;  $P = 0.02$ , for  $V_{Succ}$ , respectively). NO production was two-fold higher in the Endo compared with the Epi ( $P = 0.002$ ) and interestingly, increasing NO concentration reduced  $V_{max}$ . Mitochondrial  $H_2O_2$  and LV ROS productions were significantly increased in Endo compared to Epi, citrate synthase activity and mitochondrial coupling being similar in the two layers.

**Conclusions:** LV mitochondrial respiration transmural gradient is likely related to NO and possibly ROS increased production in the sub-endocardium.

**Keywords:** mitochondria, transmural, energetic gradient, nitric oxide, oxidative stress, heart

## INTRODUCTION

The mammalian heart presents both structural and functional heterogeneities across the left ventricular (LV) wall. Blood flow, structure, metabolism, electrophysiological, and contractile properties differ between the LV sub-endocardium (Endo) and sub-epicardium (Epi), generally supporting increased mechanical stress, contractility, and susceptibility to ischemia in Endo (Van der Vusse et al., 1990; Cazorla et al., 2005; Buckberg et al., 2008; Lou et al., 2011; Haynes et al., 2014).

Mitochondria play a critical role in ischemia/reperfusion injury and are involved both as target and source of oxidative damage (Gustafsson and Gottlieb, 2008; Lejay et al., 2014). These cell organelles produce 95% of the energy that is required by cardiomyocytes to maintain permanent contractility/relaxation cycles, participate in redox cell signaling and cell apoptosis/necrosis and are largely involved in cardiovascular diseases (Murphy et al., 2016). It is well-known that some differences exist between Endo and Epi regarding cellular properties and therefore, mitochondrial functional heterogeneities across the LV might also be expected. These data support the need to document the anatomical source of myocardial samples (Endo or Epi) when performing studies (Haynes and Campbell, 2014). Accordingly, we recently reported that Endo mitochondrial respiratory chain complex activities were reduced compared to Epi in normal rat left ventricle. Further, LV hypertrophy has been shown to modulate such gradient which might be a new marker of transition between complicated and uncomplicated LV hypertrophy (Kindo et al., 2012).

However, to date, the mechanisms involved in the transmural energetic gradient of the normal LV still remain to be determined. Key factors that deserve to be studied are reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) productions. Indeed, high oxidative stress has been related to mitochondrial dysfunction both in skeletal and in cardiac muscles (Thaveau et al., 2007; Gustafsson and Gottlieb, 2008; Charles et al., 2011; Murphy et al., 2016; Paradis et al., 2016). However, unlike during cardiac hypertrophy, our previous report did not show a transmural ROS gradient in normal LV (Kindo et al., 2012).

Interestingly, NO also modulates mitochondrial respiratory chain (MRC) activity and mitochondrial permeability transition pore (mPTP) function which opening leads to the apoptotic cascade (Brown and Borutaite, 2007; Ziolo et al., 2008; Halestrap, 2009). NO is produced by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), which catalyzes the conversion of L-arginine to L-citrulline and NO (Brown and Borutaite, 2007). Further, NO signaling pathway plays a crucial role in the pathophysiology of ischemia/reperfusion injury (Schulz et al., 2004) and studies have shown that NOS is compartmentalized within the cardiomyocytes and potentially throughout the left ventricular wall (Brahmajothi and Campbell, 1999; Barouch et al., 2002). Increased NOS and potentially ROS production in the Endo -as compared to the Epi- might therefore participate in a reduced mitochondrial respiratory chain activity in the LV endocardium.

The objectives of this study were to determine mitochondrial respiratory chain complexes activities in the normal LV and to

investigate whether NO and ROS productions are specifically increased in Endo, supporting their participation in LV transmural respiratory gradient.

## METHODS

### Animal Care

This study conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996). The protocol was approved by the University of Strasbourg Institutional Animal Care and Use Committee. Twenty-three male Wistar rats (370–470 g) were used for the experiments. The rats were provided with standard food and water ad libitum.

### Rat Heart Harvesting

Anesthesia was first induced by 4% isoflurane gas and then maintained by reducing the isoflurane concentration to 2%. Heparin was administered intraperitoneally (10,000 UI/L) to prevent any thrombi formation in the heart and coronary arteries.

A sternotomy was performed. The still-beating heart was rapidly harvested and rinsed in ice-cold 0.9% NaCl solution, and the heart and the LV were weighed. The LV-free wall was dissected, and Endo and Epi myocardial samples were extracted under binocular microscopy (Endo and Epi were the innermost and outermost layers of the LV-free wall respectively). Tissue samples were used immediately for the measurement of mitochondrial functions and  $H_2O_2$  production.

### Mitochondrial Respiratory Chain Activity and Coupling

The MRC activity was studied in saponin-skinned fibers to ensure that the global function was assessed in intact mitochondria, in their normal intracellular milieu, preserving essential interactions with other organelles (Kindo et al., 2012). Briefly, the fibers were separated and permeabilized in solution S containing saponin (50  $\mu$ g/mL) for 30 min at 4°C with shaking. The permeabilized fibers were subsequently washed for 10 min with shaking to remove the saponin. The fibers were then placed in a bath with the respiratory solution for 5 min twice to remove any phosphates. Finally, oxygen consumption was measured polarographically with a Clark-type electrode in a 3 ml oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). The basal oxygen consumption ( $V_0$ ) and maximal fiber respiration ( $V_{max}$ ) rates were measured at 22.1°C with continuous stirring in the presence of a saturating concentration of adenosine diphosphate (ADP) as a phosphate acceptor.

The relative contribution of respiratory chain complexes I, III, and IV to the global mitochondrial respiratory rate was also determined using different mitochondrial substrates and inhibitors (Thaveau et al., 2007). When  $V_{max}$  was recorded, the electron flow through complexes I, III, and IV, because both glutamate (5 mM) and malate (2 mM) were present. Complex I was inhibited with amytal (0.02 mM), and complex II was stimulated with succinate (25 mM). Mitochondrial respiration under these conditions allowed us to determine the activity



of complexes II, III and IV ( $V_{\text{mcc}}$ ). Subsequently, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM), and ascorbate (0.5 mM) were added as artificial electron donors for cytochrome c. Under these conditions, cytochrome c oxidase (complex IV) activity was maximal, and this was defined as an isolated step in the respiratory chain ( $V_{\text{tmpd}}$ ). After the experiments, fibers were harvested and dried for 15 min at 150°C and respiration rates were expressed as  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight.

Mitochondrial coupling is inferred from the acceptor control ratio ( $V_{\text{max}}/V_0$ ) which indicates the degree of coupling between oxidation and phosphorylation.  $V_{\text{max}}$  and  $V_0$  represent the maximal and the basal mitochondrial respiratory rates, respectively.

### Nitric Oxide (NO) Production

Small LV tissue samples (3.0–5.0 mg dry fiber weight) were minced and placed into separate wells of a 24-well plate with 2 mL KHB (99 mM NaCl, 4.69 mM KCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgSO}_4$ , 25 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1.03 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5.6 mM D-(+)-glucose, and 20 mM Na-HEPES, pH 7.4) that contained 200  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  and 415  $\mu\text{M}$  DETC, which were previously degassed with  $\text{N}_2$ . The tissue pieces were then incubated at 37°C with 20 mmHg  $\text{O}_2$  for 1 h and then placed on ice.

LV tissue preparation was performed as previously described (Fink et al., 2006). The tissue pieces were frozen in a syringe containing 1 mL KHB in liquid nitrogen immediately after incubation, and the samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  prior to EPR analysis. Quantification of the Fe (DETC) $^{2-}$  nitrosyl concentration in the EPR tissue was performed at  $-180^\circ\text{C}$  in a frozen dewar (Noxygen Science Transfer and Diagnostics, Elsch, Germany). The EPR settings were as follows: center field  $g = 2.03$ , field sweep = 80 G, microwave power = 43.60 mW, modulation amplitude = 8.80 G, conversion time = 20.48 ms and time constant = 81.92 ms. NO production is expressed as mg dry fiber weight/minute. The NO concentration in the LV tissue was calculated from a standard curve relating the NO concentration to the EPR signal amplitude.

### Effect of NO on Mitochondrial Respiratory Chain Activity

To investigate the effect of NO on MRC activity, the maximal fiber respiration ( $V_{\text{max}}$ ) rate was also measured in the presence of increasing concentrations of the NO donor MAHMA NONOate (10, 40, 60, and 80  $\mu\text{M}$ ) with a saturating amount of ADP as a phosphate acceptor. MAHMA NONOate is spontaneously dissociated with a half-life of 3 min at 22–25°C and liberates 2 moles of NO per mole of parent compound.

The fibers were then harvested and dried for 15 min at 150°C. The respiration rates are expressed as  $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight.

### Hydrogen Peroxide Production in Permeabilized Fibers

The  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in response to the sequential addition of substrates and inhibitors was assessed in permeabilized Endo and Epi fibers (15).  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was measured with Amplex Red reagent (Invitrogen); this reagent reacts in 1:1 stoichiometry with

$\text{H}_2\text{O}_2$  in a reaction catalyzed by HRP (horseradish peroxidase; Fluka Biochemika) to yield the fluorescent compound resorufin and a molar equivalent  $\text{O}_2$ . Resorufin has excitation/emission wavelengths of 563/587 nm and is highly stable once formed. Fluorescence was measured continuously [change in fluorescence (F)/s] with a Fluoromax 4 (Jobin Yvon) spectrofluorometer equipped with temperature control and magnetic stirring.

After the baseline in the presence of F (reactants only) was established, the reaction was initiated by addition of a permeabilized fiber bundle to 600  $\mu\text{l}$  of buffer Z with glutamate (5 mM) and malate (2.5 mM) as substrates for complex I and succinate (5 mM) as a substrate for complex II. The addition of ADP (2 mM) to the reaction buffer led to a reduction in  $\text{H}_2\text{O}_2$  release, as expected when the electron flow through the respiratory chain is stimulated. Finally, addition of the complex I inhibitor amytal (2 mM) and the complex III inhibitor antimycin (8  $\mu\text{M}$ ) led to interruption of the normal electron flow and induced an increase in the  $\text{H}_2\text{O}_2$  release. At the conclusion of each experiment, fibers were harvested and dried for 15 min at 150°C.  $\text{H}_2\text{O}_2$  production was expressed as pmol/min/mg dry weight.

### Dihydroethidium Staining

To evaluate *in situ* production of superoxide in the Endo and the Epi, serial sections (10  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a cryostat microtome and mounted onto glass slides. The slides were air-dried and incubated for 30 min at 37°C with 2.5  $\mu\text{M}$  dihydroethidium (DHE) in phosphate-buffered saline (PBS). DHE produces a red fluorescence when oxidized to ethidium bromide by the superoxide anion. After staining, the sections were washed, air-dried, mounted in a Vectashield<sup>®</sup> (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA) and covered with a cover slip. The slides were examined with an epifluorescence microscope (Nikon Eclipse E800) and a 20X epifluorescence objective; the emission signal was recorded with a Zeiss 573–637 nm filter.

### Citrate Synthase Activity

We evaluated the global mitochondrial content in Endo and Epi layers by measuring the activity of citrate synthase (Kindo et al., 2012). Citrate synthase activity was expressed as units of activity per gram of tissue wet weight (IU.gww).

### Mitochondrial Permeability Transition Pore (mPTP) Opening

Permeabilized fibers without myosin were prepared as described previously (Halestrap, 2009). Briefly, ghost fibers were prepared by incubating saponin-permeabilized bundles for 30 min with agitation at 4°C in a high-KCl buffer, which allows myosin to be extracted.  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation in the mitochondrial matrix is the most important trigger for mPTP opening. mPTP opening was assessed as described previously (Picard et al., 2008).

Briefly, we measured the mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake after the addition of a single  $\text{Ca}^{2+}$  pulse (20 nM). After the pulse was applied, we monitored the decrease in the extramitochondrial calcium concentration with the fluorescent probe Calcium Green-5N (Invitrogen). The progressive uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  by the mitochondria was monitored until mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  release

caused by mPTP opening was observed. The mitochondrial calcium retention capacity (CRC), which is a reliable index of mPTP sensitivity, was calculated as the total amount of  $\text{Ca}^{2+}$  taken up by mitochondria before  $\text{Ca}^{2+}$  release. The CRC values are expressed as mg dry fiber weight (Pottecher et al., 2016).

### Statistical Analysis

The values are expressed as the mean  $\pm$  standard error of mean (SEM). Differences in the group means were statistically analyzed by the Mann-Whitney test or a one-way analysis of variance (ANOVA) with the Newman-Keuls post-test analysis. A  $P < 0.05$  was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### Mitochondrial Content and Coupling, and Transmural Differences in Mitochondrial Respiration across the Normal Left Ventricle: Reduced Subendocardial Mitochondrial Respiratory Chain Complex Activities

No difference through the LV wall was found regarding the global mitochondrial content by measuring the activity of citrate synthase (Figure 1A;  $1510 \pm 80.3$  vs.  $1430 \pm 103.5$  mU/min/g dry weight, Endo vs. Epi respectively,  $P$  not significant).

Similarly, the acceptor control ratio ( $V_{\text{max}}/V_0$ ) indicating the degree of coupling between oxidation and phosphorylation, was similar in the two myocardial layers (Figure 1B;  $5.43 \pm 0.44$  vs.  $5.94 \pm 0.47$  for the Endo and Epi, respectively;  $P > 0.05$ ).

However, maximal mitochondrial respiratory rates ( $V_{\text{max}}$ , complexes I, III, and IV) were significantly reduced in the Endo compared with the Epi (Figure 1C;  $26.07 \pm 1.54$  vs.  $31.38 \pm 2.20$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-16.92\%$ ;  $P = 0.040$ ,  $n = 13$ ).

Likewise, there was a consistent decrease in complex II, III, and IV activity in the presence of succinate substrate ( $V_{\text{succ}}$ ) in the Endo (Figure 1B;  $18.39 \pm 0.94$  vs.  $22.63 \pm 1.39$   $\mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-18.73\%$ ;  $P = 0.025$ ).

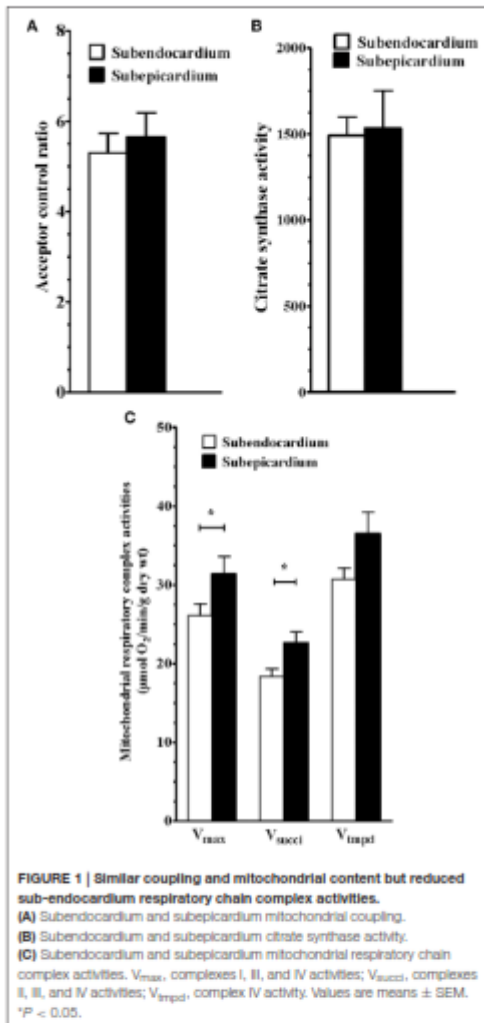
No difference between the Endo and Epi respiratory activity was observed with TMPD-ascorbate substrates (complex IV) (Table 1).

Thus, normal LV is characterized by transmural differences in mitochondrial respiratory chain complexes I, II, and III activities.

### Transmural Differences in Nitric Oxide Production across the Normal Left Ventricle and Effects of NO on Mitochondrial Respiratory Chain Complex Activities

#### Increased Subendocardial NO Production

NO production was assessed using EPR ( $n = 10$  rats), which indicated that the NO level was increased approximately two-fold



**FIGURE 1 | Similar coupling and mitochondrial content but reduced sub-endocardium respiratory chain complex activities.** (A) Subendocardium and subepicardium mitochondrial coupling. (B) Subendocardium and subepicardium citrate synthase activity. (C) Subendocardium and subepicardium mitochondrial respiratory chain complex activities.  $V_{\text{max}}$ , complexes I, II, and IV activities;  $V_{\text{succ}}$ , complexes II, III, and IV activities;  $V_{\text{tmpd}}$ , complex IV activity. Values are means  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ .

in the Endo compared with the Epi (Figure 2A;  $1.00 \pm 0.23$  vs.  $2.07 \pm 0.37$  relative NO-production, respectively;  $P = 0.002$ ).

### NO Impairs Subendocardial and Subepicardial Mitochondrial Respiratory Chain Complex Activities

With increasing concentrations of MAHMA NONOate, which is a NO donor, the maximal respiratory rates were significantly decreased in the Endo and the Epi (Figure 2B;  $n = 10$  rats). There was a dose-dependent response of  $V_{\text{max}}$  to the NO donor. At a concentration of  $40 \mu\text{M}$  MAHMA NONOate, the subendocardial

**TABLE 1 |** A comparison of the subendocardial and subepicardial MRC with various substrates and inhibitors.

	Myocardial fibers		P-value Subepicardium vs. Subendocardium
	Subepicardium	Subendocardium	
$V_{O_2}$	5.80 ± 0.74	5.15 ± 0.48	0.738
$V_{max}$	31.38 ± 2.20	26.07 ± 1.54	<b>0.040</b>
$V_{succin}$	22.63 ± 1.39	18.39 ± 0.94	<b>0.025</b>
$V_{ADP}$	36.50 ± 2.77	30.70 ± 1.45	0.260

ADP ( $V_{ADP}$ ), succinate ( $V_{succin}$ ), TMFD-ascorbate ( $V_{TMFD}$ ).

The data are presented as the mean ± SEM.

$V_{O_2}$ , basal oxygen consumption;  $V_{max}$ , complexes I, II, and IV activities;  $V_{succin}$ , complexes II, III, and IV activities;  $V_{TMFD}$ , complex IV activity.

The two values have been transcribed in bold to assess the statistical significance of these values ( $P < 0.05$ ).

$V_{max}$  was decreased 65.6% and the subepicardial  $V_{max}$  was decreased 61.0% compared with the basal  $V_{max}$  (Figure 2B).

### Transmural Differences in Reactive Oxygen Species Production across the Normal Left Ventricle: Increased Subendocardial $H_2O_2$ Production and DHE Staining

Mitochondrial  $H_2O_2$  production was significantly increased in the Endo compared with the Epi ( $n = 12$  rats; Figures 3A). In the presence of complex I glutamate-malate donors,  $H_2O_2$  release was significantly increased in the Endo compared with the Epi ( $77.54 \pm 14.20$  vs.  $31.40 \pm 6.59$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +59.50%;  $P = 0.025$ ). When the complex II donor succinate was added, no statistical difference was observed between the 2 myocardial layers. In the presence of the ADP substrate,  $H_2O_2$  release was increased in the Endo compared with the Epi ( $96.59 \pm 23.19$  vs.  $38.75 \pm 6.22$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +59.88%;  $P = 0.030$ ). These results suggest that complexes I and III of the MRC are responsible for  $H_2O_2$  production.

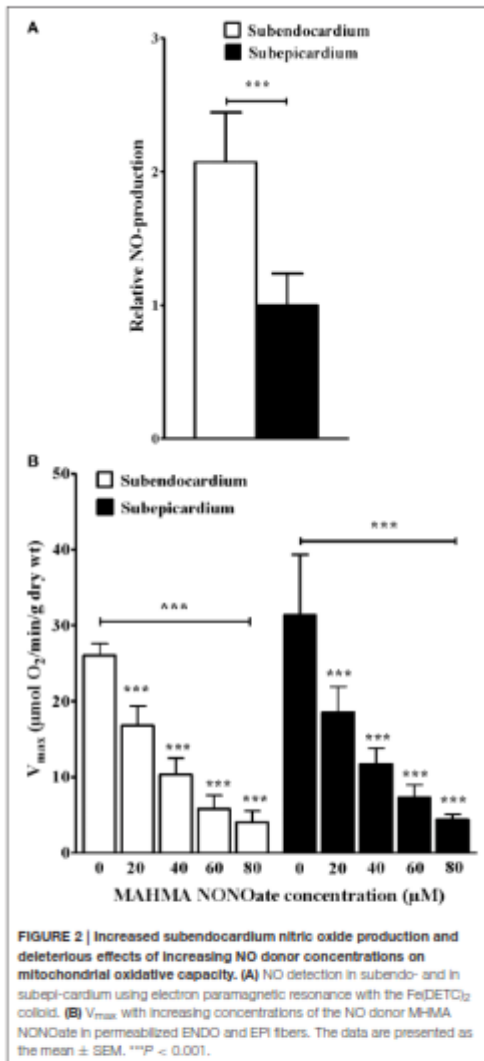
Moreover, superoxide anion production, which was measured with DHE fluorescence intensity, was significantly increased in the Endo (Figures 3B,C;  $n = 10$ ).

### Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening is Similar in Endo and Epi Layers

The sensitivity of mPTP opening was assessed fluorometrically using Calcium Green (13 rats). There was no statistical difference between the mitochondrial  $Ca^{2+}$  retention capacity for the Endo and the Epi (Figure 4).

## DISCUSSION

The main results of this study are to confirm a lower oxidative capacity of the sub-endocardium as compared to the sub-epicardium across the normal left ventricle, together with an increased nitric oxide concentration in the endocardium. Reactive oxygen species production was also enhanced in LV endocardium. Mitochondrial content and coupling are similar in both LV layers.



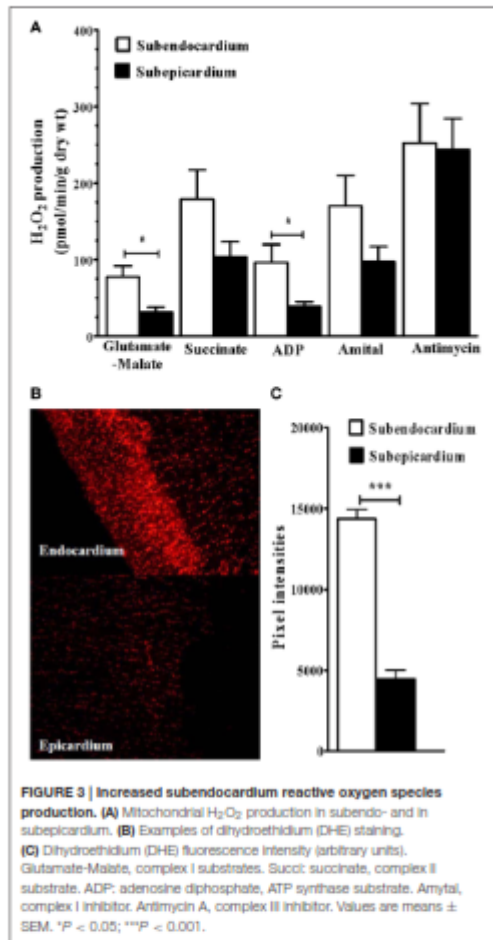
**FIGURE 2 |** Increased subendocardium nitric oxide production and deleterious effects of increasing NO donor concentrations on mitochondrial oxidative capacity. (A) NO detection in subendo- and in subepi-cardium using electron paramagnetic resonance with the Fe(DETC)<sub>2</sub> colloid. (B)  $V_{max}$  with increasing concentrations of the NO donor MAHMA NONOate in permeabilized ENDO and EPI fibers. The data are presented as the mean ± SEM. \*\*\* $P < 0.001$ .

### Reduced Subendocardial Mitochondrial Respiratory Chain Complex Activities

Despite accumulating evidences regarding myocardial heterogeneity of the normal heart, upon blood flow, structure, metabolism, electrophysiological, and contractile properties, there are few data investigating potential energetic gradient across the LV wall.

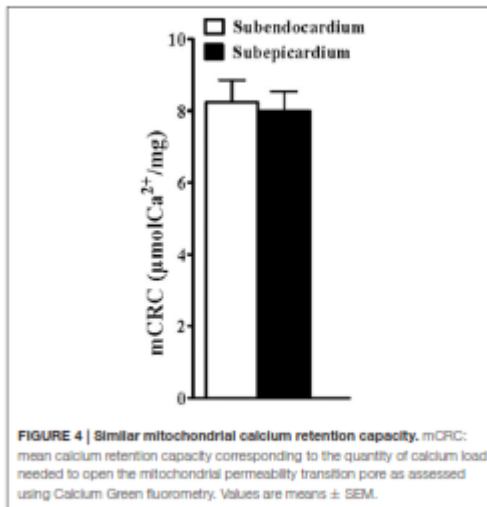
Particularly, there are only two reports using saponin-skinned fibers that ensure global mitochondrial functional assessment in





intact mitochondria (i.e., not isolated and potentially fragilized mitochondria). MacDonald et al. observed no LV transmural respiratory difference in healthy rats (MacDonald et al., 2011). On the other hand, we recently observed reduced mitochondrial respiration in the Endo as compared to the Epi (Kindo et al., 2012). Such a discrepancy was not explained since both animal models and mitochondrial respiration investigations were similar.

In the present study, subendocardial oxidative capacity was significantly lower than subepicardial capacity when using glutamate/malate or succinate, supporting that complexes I, II, and III activities of the mitochondrial respiratory chain were reduced. This result gave further *corpus* to the existence of a transmural energetic gradient in the LV wall and suggests the



need to investigate potential mechanisms involved. Since, as previously reported (Kindo et al., 2012), mitochondrial content is similar in both layers, two main candidates, NO and ROS deserve to be studied, both potentially inhibiting the mitochondrial respiration rate.

### Increased Subendocardial NO Production

NO is a free radical with a very short live in tissue. Under physiological conditions, NO detection and quantification in biological tissue is challenging (Hogg, 2010). Actually EPR NO spin-trapping allows to assess the NO tissue concentration under physiological conditions with high sensibility and specificity (Hogg, 2010).

EPR spin-trapping showed that NO level was significantly higher in the LV Endo compared with the LV Epi. Our data highlight for the first time, to our knowledge, that a transmural NO gradient exists through the LV at the basal state. Accordingly, Brahmajothi et al. have shown heterogeneous expression gradients of NOS in the LV wall with NOS1 predominately localized in LV Endo and NOS3 in LV Epi (Brahmajothi and Campbell, 1999). Taken together, these findings suggest that the compartmentalization of NOS expression is likely associated with a transmural NO gradient through the LV wall.

The physiological significance of such transmural NO gradient is still poorly known but increased NO concentration in the subendocardium may participate in the higher contractility and blood flow of the Endo compared with the Epi, previously observed in mammalian hearts (Brahmajothi and Campbell, 1999; Moore et al., 2000). Indeed, there is evidence that NOS1 has a positive inotropic effect in the heart and NO might enhance blood flow, helping maintain an adequate  $O_2$  concentration in the Endo (Ziolo et al., 2008).



Further, some new informations might be inferred from our results. Indeed, NO increase in the Endo might have been linked with the reduced subendocardial mitochondrial respiratory chain complex activities. Thus, despite a similar global mitochondrial content through the LV wall, the NO gradient observed in this study was associated with reduced complexes I, II, and III activities in the Endo compared with the Epi. To further analyze a potential relationship between increased NO and decreased mitochondrial respiratory chain function, we determined the effect of increasing dose of NO donor on the maximal oxidative capacity of both Endo and Epi LV layers.  $V_{max}$  activities decreased when the NO donor was added. This is consistent with previous data demonstrating that NO can inhibit mitochondrial respiration by reversible direct inhibition of cytochrome c oxidase and by reactive nitrate species production leading to respiratory complexes S-nitrosylation (Brown and Borutaite, 2007; Lima et al., 2010). Further, exercise-induced cardioprotection might prevent excessive NO synthesis and therefore peroxynitrite formation (Farah et al., 2013).

### Increased Subendocardial ROS Production

ROS include free radicals like superoxide anion, hydroxyl and the highly reactive compound hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$ , resulting from superoxide dismutase action on superoxide anion, can give rise to hydroxyl radicals and may impair mitochondrial respiration rates (Veal et al., 2007). Accordingly, high oxidative stress has been related to mitochondrial dysfunction during ischemia-reperfusion and therapies that decreased DHE staining were associated with mitochondrial function normalization (Charles et al., 2011).

In the present study,  $H_2O_2$  overproduction and increased DHE staining were observed in Endo, supporting an increased oxidative stress in the sub-endocardium as compared to the sub-epicardium. Such increased oxidative stress, specifically located in the Endo, might have been involved in sub-endocardium reduced mitochondrial function. However, alternatively, mitochondrial dysfunction is also a source of ROS production and mitochondrial reduced respiration might have been the origin of  $H_2O_2$  overproduction and increased DHE staining (reflecting ROS production including superoxide anion, Pottecher et al., 2013) in this study.

Interestingly, however a reduced Endo mitochondrial function was observed despite similar relative  $H_2O_2$  production in both Endo and Epi layers (Kindo et al., 2012). Thus, taken together, although the relationship between ROS production and mitochondrial oxidative capacity in Endo remains to be further studied, ROS appears not necessary in LV transmural energetic gradient genesis.

### Similar Mitochondrial Permeability Transition Pore Sensitivity in Both Endo and Epi Layers

To investigate whether reduced sub-endocardial mitochondrial respiratory chain complex activities and/or whether increased

sub-endocardial NO production might be considered as deleterious, we determined for the first time the mitochondrial permeability transition pore sensitivity in both Endo and Epi layers. Although mitochondrial membrane permeabilization can occur independent of mPTP formation, mPTP is a major large ion channel in the inner mitochondrial membrane that induces apoptosis upon opening (Halestrap, 2009). mPTP sensitivity to  $Ca^{2+}$  was constant throughout the left ventricular wall further supporting the physiological context of our study, performed in a normal heart.

In summary, our data give an overview of left ventricular wall physiology at the basal state. A transmural NO gradient, present in normal left ventricle might potentially participate in the endocardium higher contractility and blood flow. However, increased subendocardial NO concentration is associated with a decrease in the mitochondrial respiratory chain complex activity and with an increase in mitochondrial ROS production.

Such associations should probably not be viewed as impairments since they are observed in normal hearts and since the sensitivity of mPTP opening, involved in apoptosis, is similar in left ventricular wall layers.

Further studies will be useful to demonstrate if a defect in this transmural heterogeneity in NO expression modulates mitochondrial function and participate in the pathophysiology of cardiovascular diseases. Indeed, we previously observed that the level of the transmural gradient in mitochondrial respiration might be used as potential biomarker for transition from uncomplicated to complicated LV hypertrophy.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conception or design of the work: MK, SG, JB, TH, AC, FP, BG. Acquisition, analysis: MK, SG, JB, TH, AC, JZ. Interpretation of data for the work: MK, SG, JM, JZ, FP, BG. Drafting or revising the work: MK, AC, JM, BG. Final approval: MK, SG, JB, TH, AC, JM, JZ, FP, BG. Agreement to be accountable of all aspects of the work: MK, SG, JB, TH, AC, JM, JZ, FP, BG.

### FUNDING

This work was supported by a grant from the OCOVAS ('Association des opérés du coeur et des vaisseaux à Strasbourg') and the RITAC ('Recherche et Innovations Technologiques dans les Affections Cardiovasculaires').

### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Bernard Eisenmann for his generous support and encouragement during this study. We also thank Fabienne Goupilleau and Isabelle Bentz for their expert technical assistance.

## REFERENCES

- Barouch, L. A., Harrison, R. W., Skaf, M. W., Rosas, G. O., Cappola, T. P., Kobeissi, Z. A., et al. (2002). Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* 416, 337–339. doi: 10.1038/416337a
- Brahmajothi, M. V., and Campbell, D. L. (1999). Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circ. Res.* 85, 575–587. doi: 10.1161/01.RES.85.7.575
- Brown, G. C., and Borralho, V. (2007). Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc. Res.* 75, 283–290. doi: 10.1016/j.cardiores.2007.03.022
- Buckberg, G., Hoffman, J. I., Mahajan, A., Saleh, S., and Coghlan, C. (2008). Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation* 118, 2571–2587. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.754424
- Canorle, O., Szilagyi, S., Le Guennec, J. Y., Vassort, G., and Lacampagne, A. (2005). Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *PASZB J.* 19, 88–90. doi: 10.1096/fj.04.20666fj
- Charles, A. L., Guilbert, A. S., Boutbir, J., Goette-Di, M. P., Enache, I., Zoll, J., et al. (2011). Effect of preconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br. J. Surg.* 98, 511–516. doi: 10.1002/bjs.7384
- Parah, C., Kleindienst, A., Böde, G., Meyer, G., Gayraud, S., Gony, B., et al. (2013). Exercise-induced cardioprotection: a role for eNOS uncoupling and NO metabolites. *Basic Res. Cardiol.* 108:389. doi: 10.1007/s00395-013-0389-2
- Pink, B., Dikalov, S., and Pink, N. (2006). ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function. *Pharmacol. Rep.* 58(Suppl), 8–15.
- Gustafsson, A. B., and Gottlieb, R. A. (2008). Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc. Res.* 77, 334–343. doi: 10.1093/cvr/cvn005
- Malestrap, A. P. (2009). What is the mitochondrial permeability transition pore? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 821–831. doi: 10.1016/j.yjmcc.2009.02.021
- Haynes, P., and Campbell, K. S. (2014). Myocardial hypertrophy reduces transmural variation in mitochondrial function. *Front. Physiol.* 5:178. doi: 10.3389/fphys.2014.00178
- Haynes, P., Nava, K. E., Lawson, B. A., Chung, C. S., Mitrov, M. I., Campbell, S. G., et al. (2014). Transmural heterogeneity of cellular level power output is reduced in human heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 72, 1–8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2014.02.008
- Hogg, N. (2010). Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 122–129. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.009
- Kindo, M., Gerelli, S., Boutbir, J., Charles, A. L., Zoll, J., Hoang, M. Y., et al. (2012). Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. *Front. Physiol.* 3:332. doi: 10.3389/fphys.2012.00332
- Lejay, A., Meyer, A., Schlagowski, A. I., Charles, A. L., Singh, P., Boutbir, J., et al. (2014). Mitochondria: mitochondrial participation in ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50, 101–105. doi: 10.1016/j.ibocel.2014.02.013
- Lima, B., Forrester, M. Y., Hess, D. Y., and Stamler, J. S. (2010). S-nitrosylation in cardiovascular signaling. *Circ. Res.* 106, 633–646. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.207381
- Lou, Q., Fedorov, V. V., Glukhov, A. V., Mozum, N., Fast, V. G., and Efimov, I. R. (2011). Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure. *Circulation* 123, 1881–1890. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.989707
- MacDonald, J. R., Oellermann, M., Rynbeck, S., Chang, G., Ruggiero, K., Cooper, G. J., et al. (2011). Transmural differences in respiratory capacity across the rat left ventricle in health, aging, and streptozotocin-induced diabetes mellitus: evidence that mitochondrial dysfunction begins in the subepicardium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C246–C255. doi: 10.1152/ajpcell.00294.2010
- Moore, C. C., Lugo-Olivieri, C. H., McVeigh, E. K., and Zerhouni, E. A. (2000). Three-dimensional systolic strain patterns in the normal human left ventricle: characterization with tagged MR imaging. *Radiology* 214, 453–466. doi: 10.1148/radiology.214.2.r00617453
- Murphy, E., Ardehali, H., Balaban, R. S., DiLisa, P., Dorn, G. W. II, Kitsis, R. N., et al. (2016). Mitochondrial function, biology, and role in disease: a scientific statement from the American heart association. *Circ. Res.* 118, 1960–1991. doi: 10.1161/RES.0000000000000104
- Paradis, S., Charles, A. L., Meyer, A., Lejay, A., Scholey, J. W., Chakli, N., et al. (2016). The chronology of mitochondrial and cellular events during skeletal muscle ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 310, C968–C982. doi: 10.1152/ajpcell.00356.2015
- Picard, M., Csikly, K., Kobillard, M. E., Godin, R., Acab, A., Bourcier-Lucas, C., et al. (2008). Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R659–R668. doi: 10.1152/ajpregu.90357.2008
- Pottecher, J., Guillot, M., Belaid, E., Charles, A. L., Lejay, A., Gharib, A., et al. (2013). Cyclosporine A normalizes mitochondrial coupling, reactive oxygen species production, and inflammation and partially restores skeletal muscle maximal oxidative capacity in experimental aortic cross-clamping. *J. Vasc. Med. Biol.* 25, 1100–1108. doi: 10.1016/j.jvb.2012.09.020
- Pottecher, J., Kindo, M., Chamaraux-Tran, Y. N., Charles, A. L., Lejay, A., Kommel, V., et al. (2016). Skeletal muscle ischemia-reperfusion injury and cyclosporine A in the aging rat. *Paediatr. Clin. Pharmacol.* 30, 216–225. doi: 10.1111/pcp.12180
- Schulz, R., Kelms, M., and Heusch, G. (2004). Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 61, 402–413. doi: 10.1016/j.cardiores.2003.09.019
- Thawau, F., Zoll, J., Rouyer, O., Chaik, N., Kretz, J. G., Piquard, P., et al. (2007). Ischemic preconditioning specifically restores complexes I and II activities of the mitochondrial respiratory chain in ischemic skeletal muscle. *J. Vasc. Med. Biol.* 19, 541–547. doi: 10.1016/j.jvb.2007.04.075
- Van der Vusse, G., Arts, Y., Glatz, J. F., and Reneman, R. S. (1990). Transmural differences in energy metabolism of the left ventricular myocardium: fact or fiction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22, 23–37. doi: 10.1016/0022-2828(90)90969-9
- Veal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 26, 1–14. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.016
- Ziolo, M. Y., Kober, M. J., and Wang, H. (2008). Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 45, 625–632. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.07.015

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer AS and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process nevertheless met the standards of a fair and objective review.

Copyright © 2016 Kindo, Gerelli, Boutbir, Hoang Minh, Charles, Mazzucotelli, Zoll, Piquard and Gony. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## 3.6 Evaluation de la fonction mitochondriale et du stress oxydant au niveau de l'endocarde et de l'épicarde, dans un cœur sain et en surcharge

### 3.6.1 Introduction

La surcharge en pression (SP) ou en volume est une manifestation clinique fréquente, qui mène à des phénomènes de remodelage myocardique considérés comme adaptatifs au travail myocardique. L'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est à ce sujet un très bon modèle. L'HVG était considérée effectivement comme un mécanisme de compensation, permettant une adaptation au stress mécanique [120]. Or nous savons aujourd'hui que les phénomènes considérés comme adaptatifs à une surcharge en pression, ou en volume, conduisent inéluctablement à terme à l'insuffisance cardiaque [121].

L'HVG résulte d'une augmentation de la taille des cardiomyocytes, induite par une élévation du nombre d'organites intracellulaires, incluant les mitochondries. Ces dernières sont les principaux organites intracellulaires permettant la production d'énergie. Elles convertissent les nutriments en énergie par la respiration cellulaire. La dysfonction mitochondriale et l'augmentation du stress oxydant sont les principaux facteurs de la pathogénèse de l'HVG [122-125]. La flexibilité du métabolisme cardiaque est cruciale, lors d'une hypertrophie cardiaque due à une SP, le cœur passe d'une consommation d'acides gras au glucose, comme principal substrat énergétique. Ensuite, dans l'insuffisance cardiaque au stade terminal, la dysfonction mitochondriale réduirait la vitesse d'oxydation des substrats, diminuant la production d'énergie et augmentant la formation de ROS [123-127]. Lors de la présence d'un grand stress oxydant, il se produit une dysfonction cellulaire, une nécrose et/ou une apoptose [123, 124].

Le stress oxydant est lié à un excès de production de ROS originaires de plusieurs sources dans le cœur, les mitochondries, la xanthine oxydase, l'oxyde nitrique synthase découplé, les cellules inflammatoires, et les NADPH oxydases. Ils sont grandement impliqués dans le remodelage myocardique faisant face à une surcharge en pression ou en volume [128, 129]. L' $H_2O_2$  est considéré comme la plus pertinente des molécules cellulaires augmentant les radicaux hydroxyles, détériorant la capacité de la respiration mitochondriale [115].

Dans notre étude nous avons donc étudié l'adaptation énergétique et la production de ROS des couches musculaires Epi et Endo lors d'une SP débutante dans le but d'analyser la réponse myocardique soumise à un stress [122, 130-132].

Comme nous l'avons vu précédemment, en accord avec leurs différentes origines embryonnaires et contraintes, l'Endo et l'Epi du ventricule gauche présentent des caractéristiques distinctes, en terme de flux sanguin, de structure, de métabolisme, de propriétés électrophysiologiques, contractiles [133-137] et maintenant énergétiques.

Le but de notre étude était d'évaluer si conformément aux propriétés non-uniformes de la paroi du ventricule gauche, l'augmentation du stress mécanique sur la paroi myocardique pourrait détériorer le gradient respiratoire transmural. Afin d'avoir un aperçu des mécanismes impliqués, nous avons examiné la fonction respiratoire mitochondriale et la production de ROS dans les couches Endo et Epi, dans un cœur sain et après une SP.

### 3.6.2 Méthodes

Des rats mâles Wistar adultes (poids compris entre 250-300g), ont été utilisés pour les expérimentations.

#### 3.6.2.1 Design expérimental

Vingt animaux ont été aléatoirement assignés à 2 groupes, chacun comportant 10 individus. Les rats opérés de manière fictive, ont subi une procédure similaire à ce qui a été appliqué pour le groupe HVG, excepté que nous ne réalisons pas de cerclage aortique. Dans le groupe HVG, l'aorte abdominale était cerclée au-dessus des artères rénales.

Dans le Groupe SP, suite au cerclage aortique nous avons induit progressivement une HVG, sans altération de la fonction systolique ventriculaire, l'objectif recherché n'étant pas la dysfonction mais de déterminer comment le myocarde s'adaptait d'un point vue énergétique à un stress répété.

#### 3.6.2.2 Echocardiographie et remodelage cardiaque

Deux jours avant le sacrifice des animaux, une échocardiographie a été réalisée. Les paramètres suivants ont été mesurés : pourcentage de fraction de raccourcissement du ventricule gauche, fraction d'éjection du VG, masse du VG, fréquence cardiaque, diamètre télé diastolique du VG, diamètre télé systolique, épaisseur de la paroi du septum lors de la

diastole, épaisseur de la paroi postérieure lors de la diastole, et temps de relaxation isovolumétrique.

### 3.6.2.3 Mesures hémodynamiques et échantillonnage cardiaque

A la fin de l'étude, les rats ont été anesthésiés, l'artère carotide droite a été cathétérisée, pour enregistrer les pressions artérielles systolique, diastolique et moyenne. Le cathéter a ensuite été avancé, pour mesurer la pression télédiastolique du VG (PTDVG).

Par la suite, une sternotomie a été effectuée. Le cœur encore battant a été rapidement prélevé, rincé, le cœur et le VG pesés. La paroi du VG a été disséquée, et des échantillons de l'Endo et de l'Epi ont été extraits. Ces échantillons ont été immédiatement utilisés pour mesurer la fonction mitochondriale et la production de  $H_2O_2$ .

### 3.6.2.4 Respiration et couplage mitochondrial myocardique

La respiration mitochondriale dans des fibres saponifiées a été étudiée comme précédemment rapporté, assurant la détermination de la fonction mitochondriale globale, dans l'environnement architectural de la fibre musculaire [138-140].

Les contributions relatives des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, et la vitesse respiratoire mitochondriale globale sont mesurées. Concernant le couplage mitochondrial la même technique que précédemment décrite a été utilisée [141].

### 3.6.2.5 Production de $H_2O_2$ dans des fibres perméabilisées

La production de  $H_2O_2$  en réponse à l'addition séquentielle des substrats et inhibiteurs, était évaluée dans les fibres Endo et Epi perméabilisées [109].

### 3.6.2.6 Fuite de radical libre mitochondrial

La fuite de radical libre correspond à l'émission de  $H_2O_2$  par flux d' $O_2$  [142]. La production de  $H_2O_2$  et la consommation d' $O_2$  étaient mesurées en parallèle, sur le même échantillon, avec les mêmes conditions expérimentales. Cela permet le calcul de la fraction d'électrons hors de la séquence, engendrant la réduction de l' $O_2$  en ROS dans la chaîne respiratoire [143]. Le pourcentage de fuite de radical libre était calculé comme la vitesse de production d' $H_2O_2$  [144].

### 3.6.2.7 Activité de la citrate synthase

Nous avons évalué le contenu mitochondrial global, dans les couches Endo et Epi, en mesurant l'activité de la citrate synthase [145].

### 3.6.3 Résultats et discussion

La présente étude a démontré que lorsque le muscle cardiaque était soumis à une surcharge en pression, les capacités oxydatives mitochondriales diminuaient et la production de peroxyde d'hydrogène augmentait, avec une diminution du gradient transmural de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale.

#### 3.6.3.1 L'hypertrophie cardiaque débutante détériore les activités de la chaîne respiratoire mitochondriale du sous-endocarde et du sous-épicaarde.

Dans ce travail, nous avons observé que les activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont significativement réduites dans les couches Endo et Epi du VG lors d'une HVG compensatrice. Donc, lors d'une surcharge en pression, la capacité de production énergétique mitochondriale myocardique est altérée, alors même que nous avons une augmentation moyenne de 31,7% de la masse ventriculaire gauche.

#### 3.6.3.2 L'hypertrophie cardiaque débutante est associée à une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène mitochondriale et de la fuite de radical libre

Les mitochondries peuvent à la fois être la cause et la cible des espèces radicalaires. Nos résultats évaluant des fibres musculaires perméabilisées à la saponine, nous ont permis d'étudier la production d' $H_2O_2$  par les mitochondries. Les données ainsi obtenues supportent l'idée que les mitochondries participent significativement à la production d'espèce radicalaire lors d'une augmentation constante du travail myocardique. En effet, la production de  $H_2O_2$  Endo et Epi était significativement augmentée dans l'HVG par rapport aux cœurs normaux. Par conséquent en présence d'une SP, il se produit une fuite de radical libre, issue des électrons de la chaîne respiratoire mitochondriale conduisant à une réduction partielle de l' $O_2$  formant des anions superoxydes puis de l' $H_2O_2$  via la SOD [143, 144]. Cela a été observé dans l'Endo et l'Epi, ce qui signifie que les mitochondries localisées dans les deux couches du VG participaient à la surproduction de ROS et que la surcharge en pression a un retentissement sur l'ensemble des couches musculaires myocardiques. Ainsi, outre les autres sources potentielles de production de ROS dans l'HVG, notre étude permet d'affirmer que les mitochondries sont d'importantes sources productrices de ROS en présence d'une SP. Or,

comme nous le savons ces derniers activent les voies de transduction du signal pouvant induire un remodelage myocardique tel que l'HVG, mais sont aussi une source de dommage cellulaire [146].

### 3.6.3.3 L'hypertrophie cardiaque débutante est associée à une diminution du gradient transmural de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire.

Fait intéressant, l'activité transmurale du complexe IV, ou Cytochrome C oxydase, était significativement réduite dans l'HVG, par rapport aux animaux opérés de manière fictive. L'hypertrophie cardiaque réduit donc le gradient transmural énergétique du VG, principalement par une diminution de la respiration mitochondriale au niveau des couches musculaires de l'épicaarde en affectant le Complexe IV.

### 3.6.3.4 Augmentation du contenu mitochondrial Endo et Epi dans l'hypertrophie cardiaque

Dans notre étude, le contenu mitochondrial global dans les tissus augmentait, mais les capacités oxydatives mitochondriales diminuaient de façon concomitante. Ainsi, devant un stress il semblerait que le myocarde réponde dans un premier temps, pour assurer sa production énergétique, sur le plan quantitatif en activant la biogénèse mitochondriale, afin de palier à la dysfonction des chaînes respiratoire. Il avait été rapporté une diminution de la biogénèse mitochondriale en cas d'HVG, mais lors d'une hypertrophie pathologique décompensée. Abel & Doenst [147] avait récemment proposé que la biogénèse mitochondriale pouvait être maintenue dans l'hypertrophie pathologique ou augmenté dans l'hypertrophie physiologique. Dans notre étude, le contenu mitochondrial global dans les tissus augmentait, mais les capacités oxydatives mitochondriales diminuaient de façon concomitante.

### 3.6.4 Limitations de l'étude

Du fait que le poids de nos animaux était à la limite supérieure de la plage normale, il est possible que les effets de la SP puissent avoir été surestimés, en comparaison à des animaux avec un poids plus faible. En effet, en cas d'obésité, une augmentation de la pression artérielle a été observée avec un retentissement sur la croissance du VG. Ce phénomène est soit imputable à l'augmentation de stress, soit secondaire à l'activation de voie métabolique [148-150].

### 3.6.5 Conclusion

L'augmentation du travail myocardique lié à une surcharge en pression était caractérisée par une diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, associée à une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène. L'adaptation énergétique myocardique face à un stress, se fait par l'activation de la biogénèse mitochondriale.

Une diminution du gradient transmural énergétique de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, était également observée, laissant supposer une plus grande sensibilité au stress des couches Epi.

Ce travail a été publié dans « *Frontiers in physiology* ». Ci-après une version de l'article est donnée.





# Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress

Michel Kindo<sup>1,2</sup>, Sébastien Gerelli<sup>1,2</sup>, Jamal Bouitbir<sup>2,3</sup>, Anne-Laure Charles<sup>2,3</sup>, Joffrey Zoll<sup>2,3</sup>, Tam Hoang Minh<sup>1,2</sup>, Laurent Monassier<sup>4</sup>, Fabrice Favret<sup>2,5</sup>, François Piquard<sup>2,3</sup> and Bernard Geny<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Service de Chirurgie Cardiovasculaire, Pôle d'activité médico-chirurgicale Cardiovasculaire, Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>2</sup> Equipe d'Accueil 3072, Faculté de Médecine, Institut de Physiologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>3</sup> Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles, Pôle de Pathologie Thoracique, Hôpitaux Universitaires, CHRU Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>4</sup> Laboratoire de Neurobiologie et de Pharmacologie, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

<sup>5</sup> Faculté des Sciences du Sport, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

## Edited by:

Kenneth S. Campbell, University of Kentucky, USA

## Reviewed by:

Ravi C. Balijepalli, University of Wisconsin, USA

Leonardo F. Ferreira, University of Florida, USA

## \*Correspondence:

Bernard Geny, Service de Physiologie et d'Explorations Fonctionnelles et Equipe d'Accueil 3072, Université et Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 67091 Strasbourg, France.  
e-mail: bernard.geny@chru-strasbourg.fr

**Objective:** Increased mechanical stress and contractility characterizes normal left ventricular (LV) subendocardium (Endo) but whether Endo mitochondrial respiratory chain complex activities is reduced as compared to subepicardium (Epi) and whether pressure overload-induced LV hypertrophy (LVH) might modulate transmural gradients through increased reactive oxygen species (ROS) production is unknown. **Methods:** LVH was induced by 6 weeks abdominal aortic banding and cardiac structure and function were determined with echocardiography and catheterization in sham-operated and LVH rats ( $n = 10$  for each group). Mitochondrial respiration rates, coupling, content and ROS production were measured in LV Endo and Epi, using saponin-permeabilized fibers, Amplex Red fluorescence and citrate synthase activity. **Results:** In sham, a transmural respiratory gradient was observed with decreases in endo maximal oxidative capacity ( $-36.7\%$ ,  $P < 0.01$ ) and complex IV activity ( $-57.4\%$ ,  $P < 0.05$ ). Mitochondrial hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production was similar in both LV layers. Aortic banding induced mild LVH ( $+31.7\%$  LV mass), associated with normal LV fractional shortening and end diastolic pressure. LVH reduced maximal oxidative capacity ( $-23.6$  and  $-33.3\%$ ), increased mitochondrial  $H_2O_2$  production ( $+86.9$  and  $+73.1\%$ ), free radical leak ( $+27.2\%$  and  $+36.3\%$ ) and citrate synthase activity ( $+27.2\%$  and  $+36.3\%$ ) in Endo and Epi, respectively. Transmural mitochondrial respiratory chain complex IV activity was reduced in LVH ( $-57.4$  vs.  $-12.2\%$ ;  $P = 0.02$ ). **Conclusions:** Endo mitochondrial respiratory chain complexes activities are reduced compared to LV Epi. Mild LVH impairs mitochondrial oxidative capacity, increases oxidative stress and reduces transmural complex IV activity. Further studies will be helpful to determine whether reduced LV transmural gradient in mitochondrial respiration might be a new marker of a transition from uncomplicated toward complicated LVH.

**Keywords:** aortic banding, pressure overload, heart, hypertrophy, mitochondria, oxidative stress, transmural

## INTRODUCTION

Chronic pressure overload (PO) is a frequent clinical occurrence that leads to left ventricular hypertrophy (LVH). Initially, LVH was considered to be a compensatory mechanism that allows the normalization of wall mechanical stress and generation of the required cardiac output (Opie et al., 2006). However, LVH is also a risk factor for the development of heart failure and sudden death from arrhythmias. Thus, systemic hypertension and aortic

stenosis-induced LVH can become maladaptive and precede the onset of heart failure (Drazner, 2011). Accordingly, recent data support that enhanced post-operative LV mass regression after aortic valve replacement for aortic stenosis is associated with improved long-term survival (Ali et al., 2011).

LVH results from increased cardiomyocyte size induced by an increase in the number of intracellular organelles, including mitochondria. Mitochondria are the main energy powerhouses of cells, and they convert nutrients into energy through cellular respiration. Although no unique pattern of cardiac adaptation occurs in response to physiological or pathological hypertrophic stimuli, mitochondrial dysfunction and increased oxidative stress

**Abbreviations:** Endo, subendocardium; Epi, subepicardium; LV, left ventricular; LVH, left ventricular hypertrophy; PO, pressure overload; ROS, reactive oxygen species;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide.

are the primary factors in LVH pathogenesis (Ventura-Clapier et al., 2001; Seddon et al., 2007; Takimoto and Kass, 2007; Rimbaud et al., 2009). Cardiac metabolic flexibility is crucial and during PO-induced cardiac hypertrophy, the heart shifts from fatty acids to glucose as the primary substrate for energy production. Later, in end-stage heart failure, mitochondrial dysfunction may reduce the rate of substrate oxidation, decreasing energy production and increasing the formation of reactive oxygen species (ROS) (Ventura-Clapier et al., 2001; Zoll et al., 2005; Seddon et al., 2007; Takimoto and Kass, 2007; Ingwall, 2009). Under conditions of high oxidative stress, cell dysfunction, necrosis and/or apoptosis are induced (Seddon et al., 2007; Takimoto and Kass, 2007).

Oxidative stress is related to an excess production of ROS originating from several sources in the heart. Besides mitochondria, xanthine oxidase, uncoupled nitric oxide synthases, inflammatory cells, and NADPH oxidases are largely involved in cardiac remodeling, including during cardiac PO (Murdoch et al., 2006; Nabebaccus et al., 2011). ROS include several free radicals like superoxide anion, hydroxyl and the highly reactive compound hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$ , resulting from superoxide dismutase action on superoxide anion, is considered as the most relevant ROS signaling molecule in cells which can give rise to hydroxyl radicals and may impair mitochondrial respiration rates (Veal et al., 2007). We therefore investigated an eventual relationship between increased  $H_2O_2$  production and LV subendocardium (Endo) and subepicardium (Epi) mitochondrial function.

Indeed, despite its frequency, relatively few data are available and whether impaired mitochondrial oxidative capacity occurs in mild cardiac hypertrophy is still discussed (Jameel and Zhang, 2009; Rimbaud et al., 2009; Van Bilsen et al., 2009; Griffiths et al., 2010).

Interestingly, in line with their different origins during embryologic development, the LV Endo and Epi present distinct characteristics in terms of blood flow, structure, metabolism, electrophysiological, and contractile properties (Whitty et al., 1976; Cazorla et al., 2005; Sengupta et al., 2006; Duncker and Bache, 2008; Van der Velden et al., 2011). Such transmural differences are well known but, whether they are associated with transmural differences in mitochondrial complex activities deserves further analysis. Indeed, differences in subendo- and Epi mitochondria or their regulation were expected but, previous reports showed no or minor differences when considering metabolic enzymes or electron transport system (Geshi et al., 1988; Gallego-Delgado et al., 2006). However, there are few data comparing endo- and epicardium layers mitochondrial function in the normal LV, especially using saponin-skinned fibers that ensure global mitochondrial function assessment in intact mitochondria (MacDonald et al., 2011).

The aim of this study was to challenge the hypothesis that, accordingly to the non-uniform properties of the LV wall, (1) mitochondrial respiratory chain complex activities of LV Endo are reduced as compared to Epi and (2) that increased mechanical wall stress that occurs in LVH might impair such a transmural respiratory gradient. To get insight in the mechanisms involved, we also investigated ROS production in the Endo and Epi layers

through mitochondrial hydrogen peroxide measurements both in normal heart and after PO-induced LVH.

## METHODS

Adult male Wistar rats (weight range 250–300 g) were used in the experiments. Animals were kept in a temperature- and humidity-controlled room with a 12:12 h photoperiod and were provided with food and water *ad libitum*. The study conformed to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health and was approved by the institutional animal care committee.

## ANAESTHESIA AND EXPERIMENTAL DESIGN

Twenty animals were randomly assigned to two groups of ten each. Sham-operated rats underwent a procedure similar to that applied to the LVH group except that the aorta was not banded in sham-operated animals. In the LVH group, the abdominal aorta was banded above the renal arteries. During the procedure, anaesthesia was induced with 3% isoflurane and oxygen (1 l/min) in an induction chamber (Minerve, Esternay, France). After the peritoneum was opened, 5 mg/kg of intraperitoneal tramadol was administered. Anaesthesia was maintained with 1.5% isoflurane and 1 l/min oxygen at under spontaneous ventilation. The animal's core body temperature was maintained at 37°C using a controlled heating pad (Homeothermic blanket control unit, Harvard Apparatus®). The suprarenal abdominal aorta was exposed after a laparotomy was performed. A 4-0 silk suture was used to tie off the suprarenal abdominal aorta using a blunted 22 gauge needle, which was then pulled out. Following the surgery, the animals' housing conditions were kept constant during a 6-week period.

In animal models of PO secondary to aortic banding, ventricular remodeling and function depend upon several factors including localization of the aortic banding, degree of aortic coarctation and age of the animal at the time of the surgery. Our experimental design was expected to induce a progressive LVH with no alteration of the systolic ventricular function. These parameters were chosen in order to mimic common clinical settings such as systemic hypertension or aortic stenosis.

## ECHOCARDIOGRAPHY AND CARDIAC REMODELLING

Two days before the animals sacrifice, echocardiography was performed. The following parameters were measured in isoflurane-anaesthetized rats by two-dimensional and Doppler echocardiography (Sonos 5500, Philips Ultrasound) with a 12-MHz phased-array transducer (S12): percentage of LV fractional shortening, LV ejection fraction, LV mass, heart rate, LV end-diastolic, and end-systolic diameter, septum wall thickness in diastole, posterior wall thickness in diastole and isovolumic relaxation time. The LV mass was derived from the cubic equation at end diastole as follows:  $LV\ mass = 0.8\ (1.4)\ [(interventricular\ septal\ dimension\ at\ diastole + LV\ end-diastolic\ dimension + posterior\ wall\ thickness\ at\ diastole)^3 - (LV\ end-diastolic\ dimension)^3] + 0.6$  (Seddon et al., 2007). The isovolumic relaxation time, marker of the diastolic dysfunction in correlation with the filling pressure, was measured with Doppler imaging using the apical four-chamber view (Cantor et al., 2005).



#### HEMODYNAMIC MEASUREMENTS AND CARDIAC SAMPLING

At the end of the experiments, the rats were anaesthetized as previously described, and the right carotid artery was catheterized (arterial catheter, 3Fr, Vycon) for the recording of systolic, diastolic and mean arterial pressures (PowerLab, AD Instruments). The catheter was then pushed, and the LV end-diastolic pressure (LVEDP) was measured.

Thereafter, a sternotomy was performed. The still-beating heart was rapidly harvested and rinsed in ice-cold 0.9% NaCl solution, and the heart and the LV were weighed. The LV-free wall was dissected, and Endo and Epi myocardial samples were extracted under binocular microscopy (Endo and Epi were the innermost and outermost layers of the LV-free wall, respectively). Samples were used immediately for the measurement of mitochondrial function and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production.

#### MYOCARDIAL MITOCHONDRIAL RESPIRATION AND COUPLING

Mitochondrial respiration in saponin-skinned fibers was studied as previously reported and recently reviewed, ensuring determination of global mitochondrial function within the architectural environment of the muscle fiber (Veksler et al., 1987; Zoll et al., 2006; Kuznetsov et al., 2008). Briefly, fibers were separated and permeabilized in a bath of solution 5 containing saponin (50 µg/mL) for 30 min at 4°C with shaking. The permeabilized fibers were then washed for 10 min with shaking to remove saponin and rinsed twice with the respiratory solution for 5 min to remove any phosphates. The oxygen consumption of the fibers was measured polarographically using a Clark-type electrode in a 3-mL oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments, Glasgow, Scotland). Basal oxygen consumption ( $V_o$ ) and maximal fiber respiration ( $V_{max}$ ) rates were measured at 22.1°C under continuous stirring in the presence of a saturating amount of adenosine diphosphate (ADP) as a phosphate acceptor.

The relative contributions of respiratory chain complexes I, III and IV to global mitochondrial respiratory rates were also determined. When  $V_{max}$  was recorded, the electron flow occurred in complexes I, III, and IV because of the presence of glutamate (5 mM) and malate (2 mM). Complex I was blocked with amyltal (0.02 mM), and complex II was stimulated with succinate (25 mM). The measurement of mitochondrial respiration under these conditions permitted the determination of complex II, III, and IV activities ( $V_{succ}$ ). After this measurement was completed, N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, 0.5 mM) and ascorbate (0.5 mM) were added as artificial electron donors to cytochrome c. Under these conditions, the activity of cytochrome c oxidase (complex IV) was increased to its maximum and could be determined as an isolated step in the respiratory chain ( $V_{tmpd}$ ). Following the completion of these measurements, the fibers were harvested and dried for 15 min at 150°C. Respiration rates are expressed as µmol O<sub>2</sub>/min/g dry weight.

Concerning mitochondrial coupling, when permeabilized fibers are used instead of isolated mitochondria, endogenous ATPases prevent the establishment of state 4. The "state 2" is then used. This state is the basal oxygen consumption under glutamate and malate substrates. The ratio (state 3 rate)/(state 2 rate)

is called the acceptor control ratio (ACR) and is viewed as an approach of mitochondrial coupling (Duteil et al., 2010).

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> PRODUCTION IN PERMEABILIZED FIBERS

The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in response to the sequential addition of substrates and inhibitors was assessed in permeabilized Endo and Epi fibers (Anderson and Neuffer, 2006). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured with Amplex Red reagent (Invitrogen); this reagent reacts in 1:1 stoichiometry with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a reaction catalyzed by HRP (horseradish peroxidase; Fluka Biochemika) to yield the fluorescent compound resorufin and a molar equivalent O<sub>2</sub>. Resorufin has excitation/emission wavelengths of 563/587 nm and is highly stable once formed. Fluorescence was measured continuously [change in fluorescence (ΔF)/sec] with a Fluoromax 4 (Jobin Yvon) spectrofluorometer equipped with temperature control and magnetic stirring. After the baseline in the presence of ΔF (reactants only) was established, the reaction was initiated by addition of a permeabilized fiber bundle to 600 µL of buffer Z with glutamate (5 mM) and malate (2.5 mM) as substrates for complex I and succinate (5 mM) as a substrate for complex II. The addition of ADP (2 mM) to the reaction buffer led to a reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release, as expected when the electron flow through the respiratory chain is stimulated. Finally, addition of the complex I inhibitor amyltal (2 mM) and the complex III inhibitor antimycin (8 µM) led to interruption of the normal electron flow and induced an increase in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release.

#### MITOCHONDRIAL FREE RADICAL LEAK

The free radical leak correspond to the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission per O<sub>2</sub> flux (Picard et al., 2011). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and O<sub>2</sub> consumption were measured in parallel in the same sample under similar experimental conditions. This allowed the calculation of the fraction of electrons out of sequence which reduce O<sub>2</sub> to ROS in the respiratory chain (the percent of free radical leak) instead of reaching cytochrome oxidase to reduce O<sub>2</sub> to water (Anderson et al., 2009). Because two electrons are needed to reduce 1 mole of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, whereas four electrons are transferred in the reduction of 1 mole of O<sub>2</sub> to water, the percent free radical leak was calculated as the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production divided by two times the rate of O<sub>2</sub> consumption, and the result was multiplied by 100 (Bouitbir et al., 2012).

#### CITRATE SYNTHASE ACTIVITY

We evaluated the global mitochondrial content in Endo and Epi layers by measuring the activity of citrate synthase (Srere, 1969). Citrate synthase activity was expressed as units of activity per gram of tissue wet weight (IU.g ww).

#### STATISTICAL ANALYSIS

Values are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM). Comparisons of the group means were analyzed by the Mann-Whitney test or by a Student *t*-test. *P* < 0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using the Prism database (GraphPad Prism 5, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## RESULTS

### CLINICAL, ANATOMICAL, AND ECHOCARDIOGRAPHIC CHARACTERISTICS OF THE SHAM-OPERATED AND THE LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY GROUPS

PO induced LV remodeling with significant cardiac hypertrophy, as inferred from the 31.7% increase in LV mass (Tables 1 and 2). The LV remodeling was concentric and involved similar thickening of the septal and the posterior walls (Table 2). None of the animals developed clinical evidence of heart failure or impaired systolic or diastolic cardiac functions, as inferred from the normal echocardiographic values of LV fractional shortening, ejection fraction and isovolumic relaxation time and of LV end diastolic pressures in the LVH rats.

### REDUCED MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX ACTIVITIES IN CARDIAC HYPERTROPHY

Mitochondrial respiration measured *in situ* allows characterization of functional mitochondria in their normal intracellular assembly and position, preserving essential interactions with other organelles. Further, using different mitochondrial

substrates and inhibitors, the relative contributions of respiratory chain complexes I, III, and IV to global mitochondrial respiratory rates can be determined.

Concerning the endocardium, maximal oxidative capacity ( $V_{max}$ ; complexes I, III, and IV activities) was significantly decreased in the LVH group ( $n = 10$ ) compared with the sham-operated group ( $n = 10$ ) ( $20.1 \pm 1.1$  vs.  $26.3 \pm 1.6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-23.6\%$ ,  $P < 0.01$ ; Figure 1A).

In the LVH group,  $V_{succ}$  (complexes II, III, and IV activities) tended to be decreased ( $18.9 \pm 1.8$  vs.  $23.9 \pm 2.1 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-20.9\%$ ,  $P$  not significant).

$V_{impd}$  (complex IV activity) was significantly decreased ( $34.1 \pm 2.8$  vs.  $43.2 \pm 2.7 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-20.8\%$ ,  $P = 0.04$ ).

Concerning the epicardium, similarly,  $V_{max}$  was significantly decreased in the LVH group compared with the sham-operated group ( $23.9 \pm 0.9$  vs.  $35.9 \pm 2.2 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-33.3\%$ ,  $P < 0.001$ ; Figure 1B).  $V_{succ}$  tended to be lower ( $22.3 \pm 1.6$  vs.  $29.8 \pm 3.6 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively;  $-25.1\%$ ,  $P = 0.07$ ).  $V_{impd}$  was significantly decreased ( $38.3 \pm 2.4$  vs.  $68.0 \pm 4.4 \mu\text{mol O}_2/\text{min/g}$  dry weight, respectively,  $-43.6\%$ ,  $P < 0.001$ ).

**Table 1 | Clinical and anatomical characteristics in sham-operated and LV hypertrophy groups.**

	Sham-operated ( $n = 10$ )	LVH ( $n = 10$ )	$P$
Heart rate (cycles/min)	$396.68 \pm 10.43$	$394.51 \pm 12.43$	NS
SAP (mmHg)	$119.09 \pm 3.91$	$142.46 \pm 8.14$	0.016
DAP (mmHg)	$94.85 \pm 5.32$	$104.59 \pm 9.34$	NS
MAP (mmHg)	$105.3 \pm 3.88$	$116.54 \pm 9.54$	NS
LVEDP (mmHg)	$6.81 \pm 1.10$	$7.77 \pm 1.06$	NS
Body weight (g)	$500.30 \pm 11.31$	$477.80 \pm 24.13$	NS
Heart weight (g)	$0.930 \pm 0.02$	$1.140 \pm 0.22$	0.012
Left ventricle weight (g)	$0.760 \pm 0.01$	$0.967 \pm 0.07$	0.015

SAP, systolic arterial pressure; DAP, diastolic arterial pressure; MAP, mean arterial pressure; LVEDP, left ventricular end-diastolic pressure; LVH, left ventricular hypertrophy; NS, not significant. Values are means  $\pm$  S.E.M.

**Table 2 | Echocardiographic characteristics in sham-operated and LV hypertrophy groups.**

	Sham-operated ( $n = 10$ )	LVH ( $n = 10$ )	$P$
LVFS (%)	$41.93 \pm 1.30$	$43.47 \pm 1.93$	NS
LVEF (%)	$77.37 \pm 1.50$	$78.95 \pm 7.28$	NS
LVEDD (mm)	$7.94 \pm 0.17$	$8.44 \pm 0.27$	NS
LVEDS (mm)	$4.61 \pm 0.12$	$4.79 \pm 0.30$	NS
Sd (mm)	$1.27 \pm 0.03$	$1.42 \pm 0.05$	0.05
PWd (mm)	$1.15 \pm 0.03$	$1.40 \pm 0.06$	0.007
LVM (g)	$1.07 \pm 0.05$	$1.41 \pm 0.10$	0.02
IVRT (ms)	$23.68 \pm 0.12$	$23.83 \pm 0.93$	NS

LVFS, left ventricular fractional shortening; LVEF, left ventricular ejection fraction; LVEDD, left ventricular end-diastolic diameter; LVEDS, left ventricular end-systolic diameter; Sd, septum wall thickness in diastole; PWd, posterior wall thickness in diastole; LVM, left ventricular mass; IVRT, isovolumic relaxation time. LVH, left ventricular hypertrophy; NS, not significant. Values are means  $\pm$  S.E.M.

### TRANSMURAL DIFFERENCES IN MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX ACTIVITIES ACROSS THE NORMAL LEFT VENTRICLE AND IN LVH

To compare both LV layers, we considered Epi mitochondrial complex activities normalized to their respective Endo values (Figure 1C).

In normal hearts,  $V_{max}$  was 36.5% lower ( $P < 0.01$ ),  $V_{succ}$  was 24.6% lower ( $P$  not significant, 0.147) and  $V_{impd}$  was 57.4% lower ( $P < 0.05$ ) in the Endo than in the Epi layers. Thus, normal LV is characterized by transmural differences in mitochondrial respiratory chain complexes I, III, and IV activities.

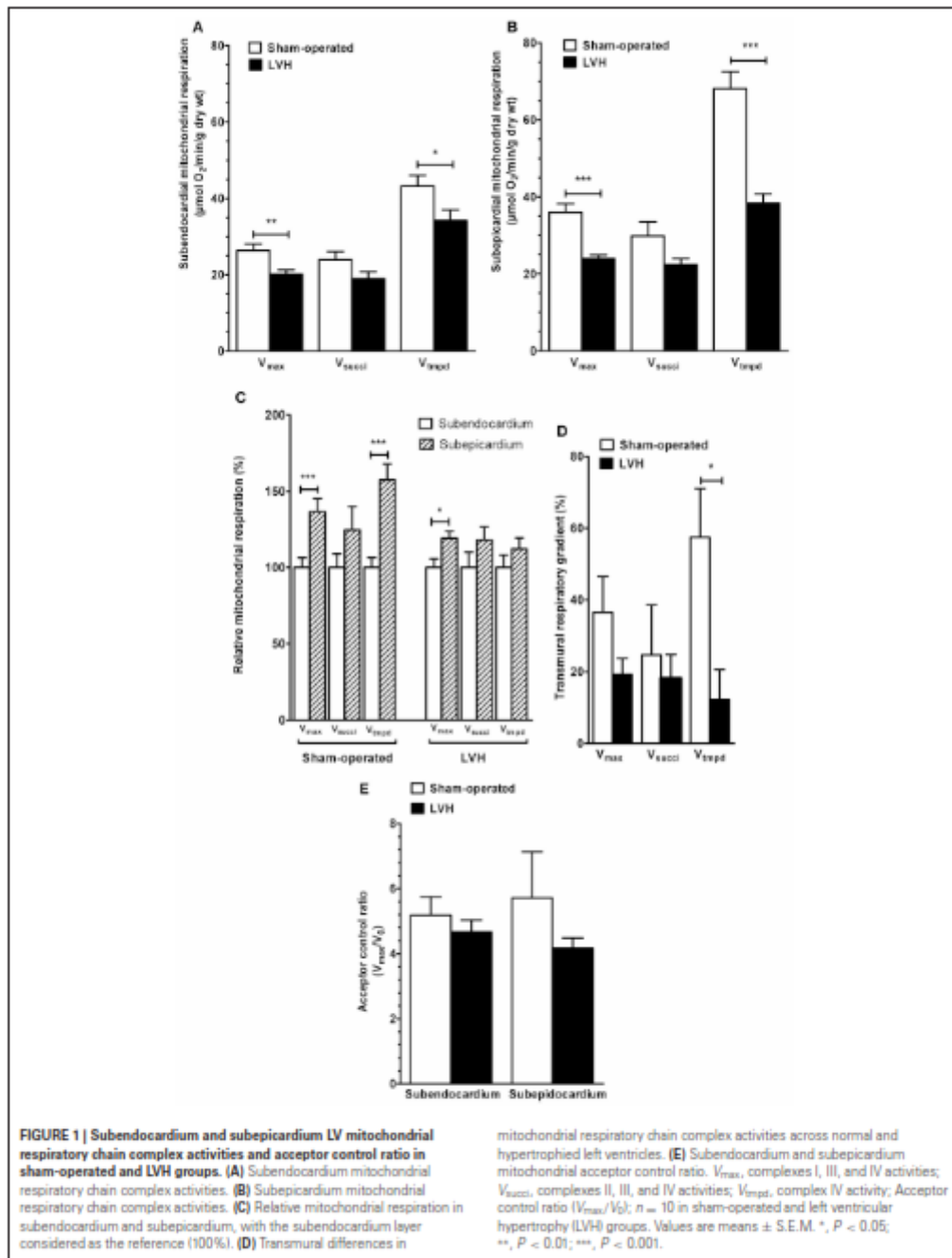
In the LVH group,  $V_{max}$  was 19.1% lower in Endo compared with Epi ( $p = 0.028$ ), but  $V_{succ}$  and  $V_{impd}$  decrease ( $-18.0$  and  $-12.2\%$ , respectively) failed to reach statistical significance.

The ACR ( $V_{max}/V_0$ ), representing the degree of coupling between oxidation and phosphorylation, was not different when comparing Epi and Endo LV layers both in sham and LVH rats (Figure 1D).

To determine whether pressure-overload modify the transmural differences in mitochondrial respiratory chain complex activities observed across the normal left ventricle, we compared such transmural gradient using the three main substrates. In the LVH group, the transmural respiratory gradient was significantly lower -as compared to normal LV- for  $V_{impd}$  assessing complex IV activity ( $-57.4$  vs.  $-12.2\%$  for;  $P = 0.02$ , Figure 2).  $V_{max}$  and  $V_{succ}$  transmural energetic gradient were not significantly reduced in the LVH group ( $P = 0.18$  and  $P = 0.95$ , respectively).

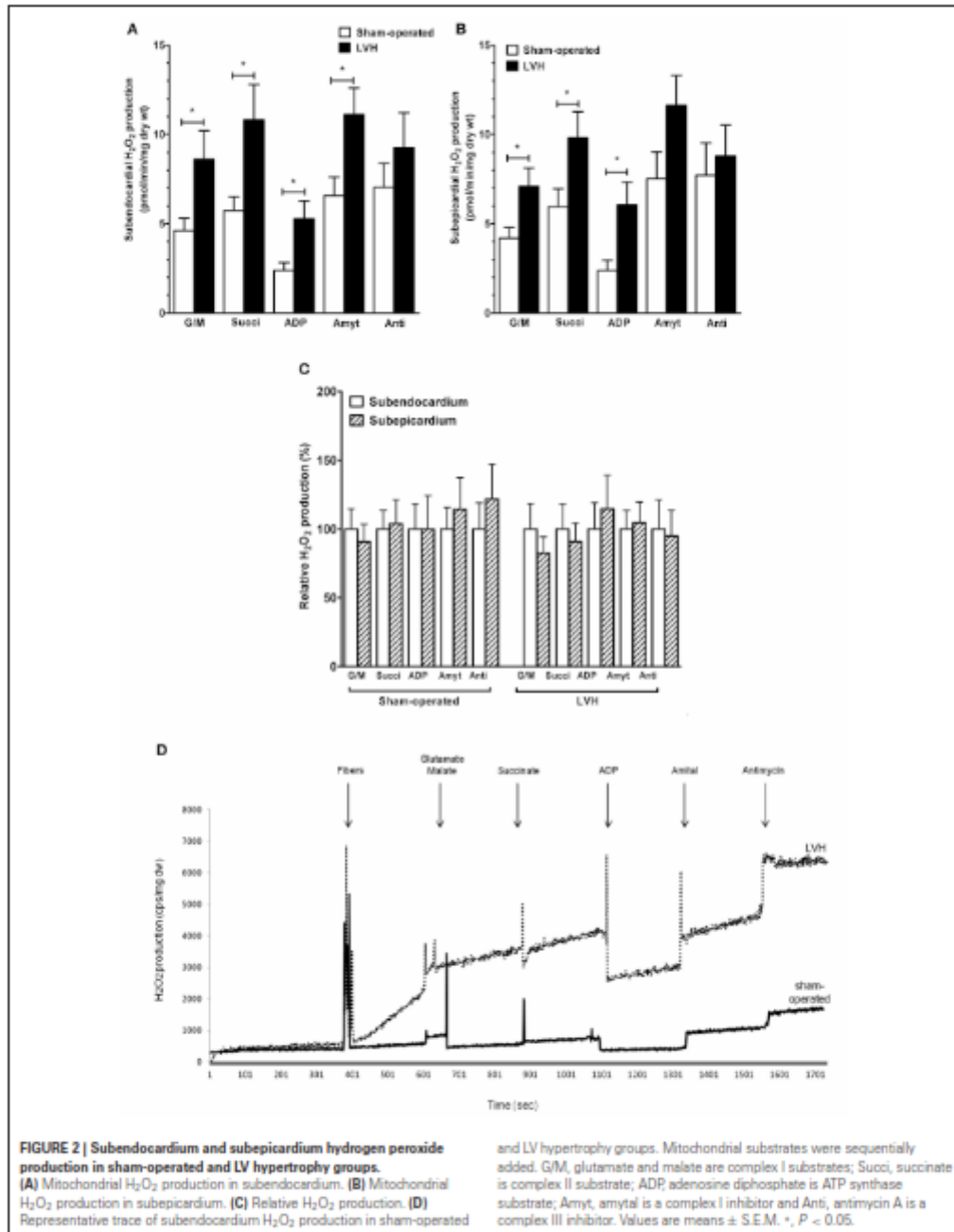
### ENHANCED PRODUCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN SUBENDOCARDIUM AND SUBEPICARDIUM LAYERS DURING CARDIAC HYPERTROPHY

$\text{H}_2\text{O}_2$  production rate was calculated from the slope of  $\Delta\text{F}/\text{min}$ , after subtracting background, from a standard curve established with the appropriate reaction conditions. At the conclusion of



**FIGURE 1 | Subendocardium and subepicardium LV mitochondrial respiratory chain complex activities and acceptor control ratio in sham-operated and LVH groups. (A)** Subendocardium mitochondrial respiratory chain complex activities. **(B)** Subepicardium mitochondrial respiratory chain complex activities. **(C)** Relative mitochondrial respiration in subendocardium and subepicardium, with the subendocardium layer considered as the reference (100%). **(D)** Transmural differences in

mitochondrial respiratory chain complex activities across normal and hypertrophied left ventricles. **(E)** Subendocardium and subepicardium mitochondrial acceptor control ratio. V<sub>max</sub>, complexes I, III, and IV activities; V<sub>subcc1</sub>, complexes II, III, and IV activities; V<sub>subc4</sub>, complex IV activity; Acceptor control ratio (V<sub>max</sub>/V<sub>0</sub>); n = 10 in sham-operated and left ventricular hypertrophy (LVH) groups. Values are means ± S.E.M. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; \*\*\*, P < 0.001.





each experiment, fiber bundles were dried at 150°C, 15 min. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production is expressed as picomoles per minute per milligram of dry weight.

The relative contributions of respiratory chain complexes to global mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rate were determined using different substrates and inhibitors as depicted in the Figure legend.

The subendocardial mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the presence of the complex I substrates glutamate and malate (Figure 2A) was significantly increased in the LVH group ( $n = 10$ ) compared with the sham-operated animals ( $n = 10$ ) ( $47.3 \pm 8.7$  vs.  $25.4 \pm 3.7$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +86.9%,  $P = 0.03$ ).

In the presence of the complex II substrate succinate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was also higher in the LVH group than in the sham-operated group ( $59.4 \pm 10.9$  vs.  $31.5 \pm 4.24$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +89.4%,  $P = 0.04$ ). In the presence of ADP, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was greater in the LVH group than in the sham-operated group ( $29.0 \pm 5.5$  vs.  $13.1 \pm 2.4$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +126.0%,  $P = 0.01$ ). In the presence of amytal, a complex I inhibitor, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release was higher in the LVH group than in the sham-operated group ( $61.1 \pm 8.1$  vs.  $36.1 \pm 5.7$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +70.7%,  $P = 0.02$ ). Finally, in the presence of the complex III inhibitor antimycin A, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release tended to be greater in the LVH group.

The subepicardial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitochondrial production in the presence of glutamate and malate (Figure 2B) was significantly increased in the LVH group compared with the sham-operated group ( $39.0 \pm 5.6$  vs.  $23.0 \pm 3.2$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +73.1%,  $P = 0.02$ ). With succinate as the substrate, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was also higher in the LVH group than in the sham-operated group ( $53.9 \pm 8.0$  vs.  $32.7 \pm 5.4$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +66.1%,  $P = 0.02$ ). The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release in the presence of ADP was also greater in the LVH group ( $33.3 \pm 7.0$  vs.  $13.0 \pm 3.1$  pmol/min/mg dry weight, respectively; +163.0%,  $P = 0.01$ ). In the presence of amytal and antimycin A, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release did not differ significantly between the two groups.

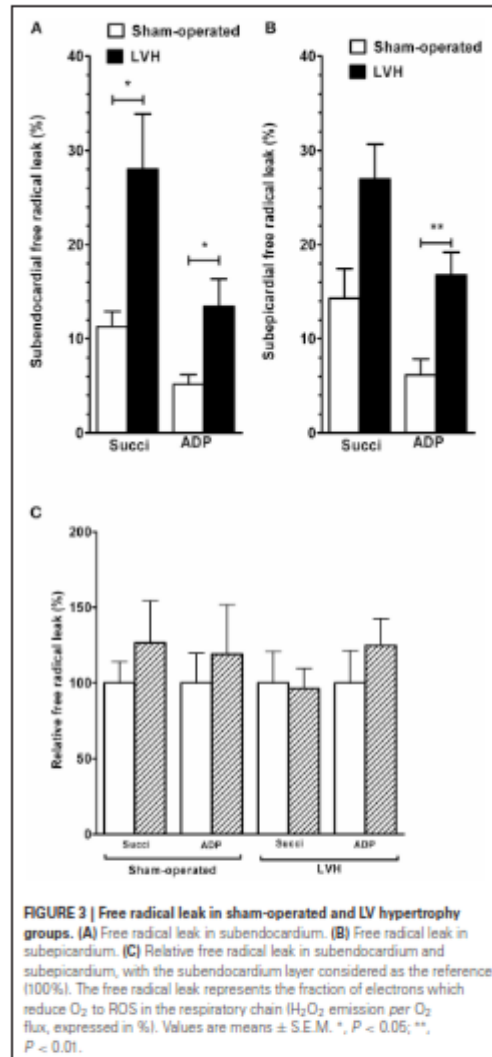
The endocardial and epicardial LV production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were similar in normal and in hypertrophied hearts, and no transmural gradient was observed with any substrate in either group (Figure 2C).

Figure 2D shows a representative trace of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in Endo sham-operated and Endo LV hypertrophy groups.

Mitochondrial substrates were sequentially added. G/M, glutamate (5 mM) and malate (2 mM) are complex I substrates; Succinyl succinate (5 mM) is complex II substrate; ADP, adenosine diphosphate (2 mM) is ATP synthase substrate; Amyt, amytal (2 mM) is a complex I inhibitor and Anti, antimycin A (8 microM) is a complex III inhibitor.

#### ENHANCED FREE RADICAL LEAK IN SUBENDOCARDIUM AND SUBEPICARDIUM LAYERS DURING CARDIAC HYPERTROPHY

To further analyze the production of ROS in Endo and Epi layers, we determined the mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission per O<sub>2</sub> flux corresponding to the mitochondrial free radical leak (Picard et al., 2011).



**FIGURE 3 | Free radical leak in sham-operated and LV hypertrophy groups. (A)** Free radical leak in subendocardium. **(B)** Free radical leak in subepicardium. **(C)** Relative free radical leak in subendocardium and subepicardium, with the subendocardium layer considered as the reference (100%). The free radical leak represents the fraction of electrons which reduce O<sub>2</sub> to ROS in the respiratory chain (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission per O<sub>2</sub> flux, expressed in %). Values are means  $\pm$  S.E.M. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

The Endo mitochondrial free radical leak in the presence of succinate (Figure 3A) was significantly increased in the LVH group compared with the sham-operated animals ( $28.0 \pm 15.5$  vs.  $11.2 \pm 4.2$  %, respectively; +150.0%,  $P = 0.03$ ). In the presence of ADP, free radical leak was also higher in the LVH group than in the sham-operated group ( $13.4 \pm 2.8$  vs.  $5.1 \pm 2.6$  %, respectively; +162.7%,  $P = 0.01$ ).

The Epi free radical leak in the presence of succinate (Figure 3B) was not significantly different in the LVH group compared with the sham-operated group ( $26.9 \pm 9.8$  vs.  $14.3 \pm 8.2$

%, respectively;  $+88.1\%$ ,  $P = 0.07$ ). The free radical leak in the presence of ADP was also greater in the LVH group ( $16.7 \pm 6.3$  vs.  $6.1 \pm 4.4\%$ , respectively;  $+173.7\%$ ,  $P = 0.004$ ).

The endocardial and epicardial LV free radical leak were similar in normal and in hypertrophied hearts, and no transmural gradient was observed with any substrate in either group (Figure 3C).

#### INCREASED SUBENDOCARDIAL AND SUBEPICARDIAL MITOCHONDRIAL CONTENT IN CARDIAC HYPERTROPHY

We evaluated the global mitochondrial content in tissues by measuring the citrate synthase activity. During mild cardiac hypertrophy, mitochondrial content increased by 27.2 and 36.3% in Endo and Epi, respectively (Figure 4). No differences in citrate synthase activity through the different layers of the LV wall were observed either in the sham-operated or the LVH group.

When normalizing the data on CS activity, differences were amplified for respiration and reduced for  $H_2O_2$  (Figures 5 and 6).

Thus, Endo and Epi mitochondrial respiratory chain complexes activities were globally decreased in LVH as compared to sham hearts ( $-40.0\%$ ,  $p = 0.0006$ ;  $-37.5\%$ ,  $p = 0.0093$ ; and  $-37.7\%$ ,  $p = 0.0012$  for  $V_{max}$ ,  $V_{succi}$  and  $V_{tmpd}$  in Endo and  $-51.7\%$ ,  $p = 0.0041$ ;  $-45.4\%$ ,  $p = 0.073$  and  $-58.4\%$ ,  $p = 0.0006$  for  $V_{max}$ ,  $V_{succi}$ , and  $V_{tmpd}$  in Epi, respectively).

The relative mitochondrial respiration was increased in Epi, as compared to Endo, for  $V_{max}$  and  $V_{tmpd}$  in sham ( $+78.9\%$ ,  $p = 0.026$  and  $+102.6\%$ ,  $p = 0.0006$ , respectively) and for  $V_{tmpd}$  in LVH ( $+35.1\%$ ,  $p = 0.0093$ ) but statistical significance of complex 4 transmural gradient decrease in LVH was lost after

normalization. Finally, ACR decrease was significant in LVH Epi ( $-44.49\%$ ,  $p = 0.011$ ).

Concerning  $H_2O_2$  production, after normalizing on citrate synthase activity, LVH Endo and Epi still demonstrated significant increases as compared to sham hearts when using ADP as substrate ( $+79.4\%$ ,  $p = 0.022$  and  $+109.1\%$ ,  $p = 0.027$ ) in Endo and Epi, respectively. Again, endo and Epi relative  $H_2O_2$  production did not differ in sham and in LVH groups.

#### DISCUSSION

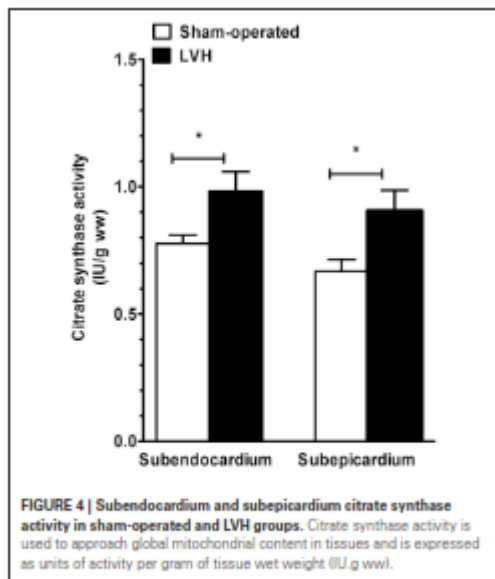
The present study demonstrates (1) transmural differences in mitochondrial respiratory chain complex activities across the normal left ventricle, with a lower oxidative capacity of the Endo as compared to the Epi; (2) that aortic-banding-induced mild cardiac hypertrophy decreased mitochondrial oxidative capacities and enhanced hydrogen peroxide production; and (3) that cardiac hypertrophy was associated with a decreased transmural gradient in mitochondrial respiratory chain complex IV activity.

#### TRANSMURAL DIFFERENCES IN MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX ACTIVITIES ACROSS THE NORMAL LEFT VENTRICLE

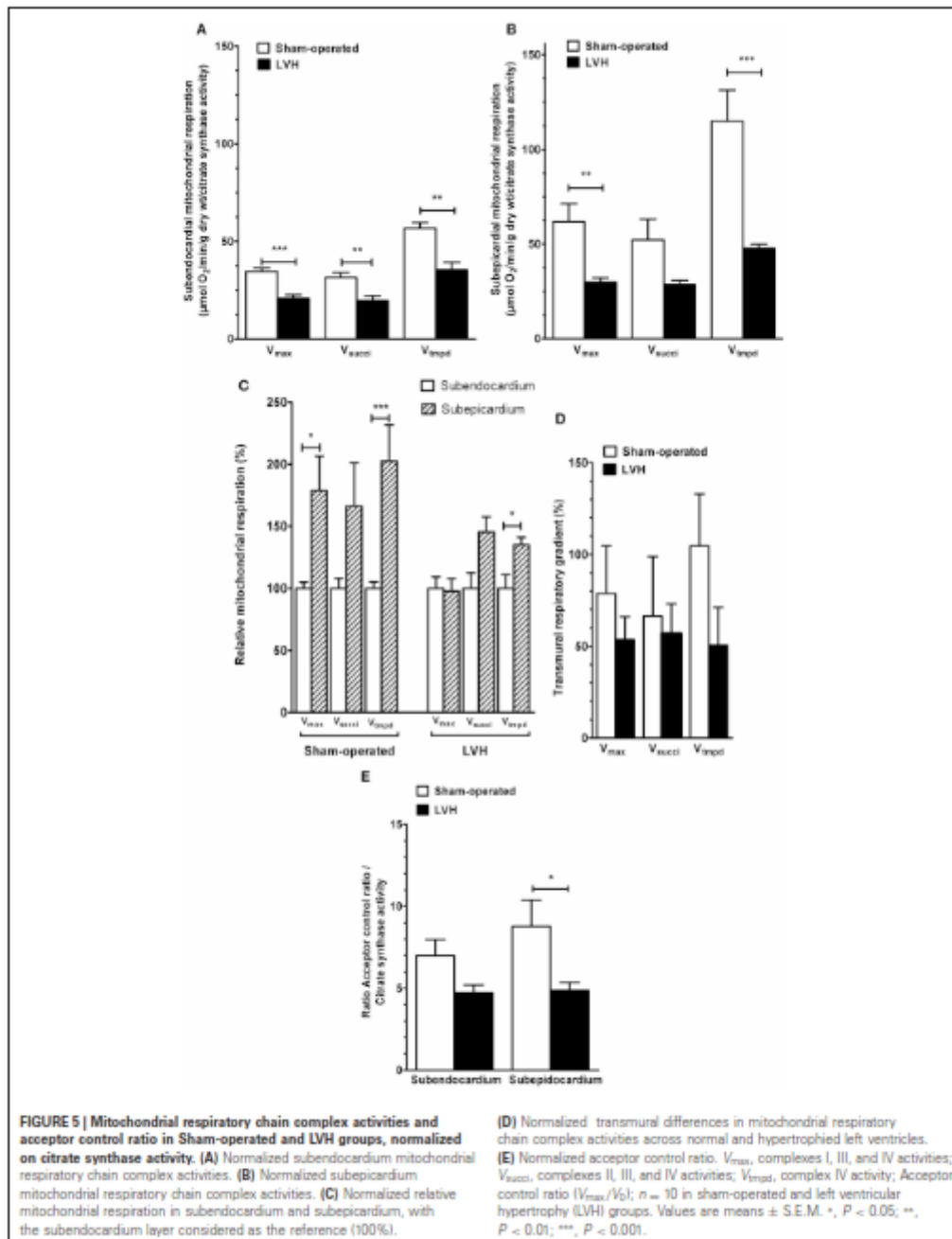
A considerable body of evidence has been accumulated regarding myocardial heterogeneity of the normal heart, including different blood flow, structure, metabolism, electrophysiological, and contractile properties and generally supporting increased mechanical stress and contractility in Endo (Whitty et al., 1976; Smith et al., 1990; Sonntag et al., 1996; Cazorla et al., 2005; Sengupta et al., 2006; Buckberg et al., 2008; Duncker and Bache, 2008; Lou et al., 2011; Van der Velden et al., 2011).

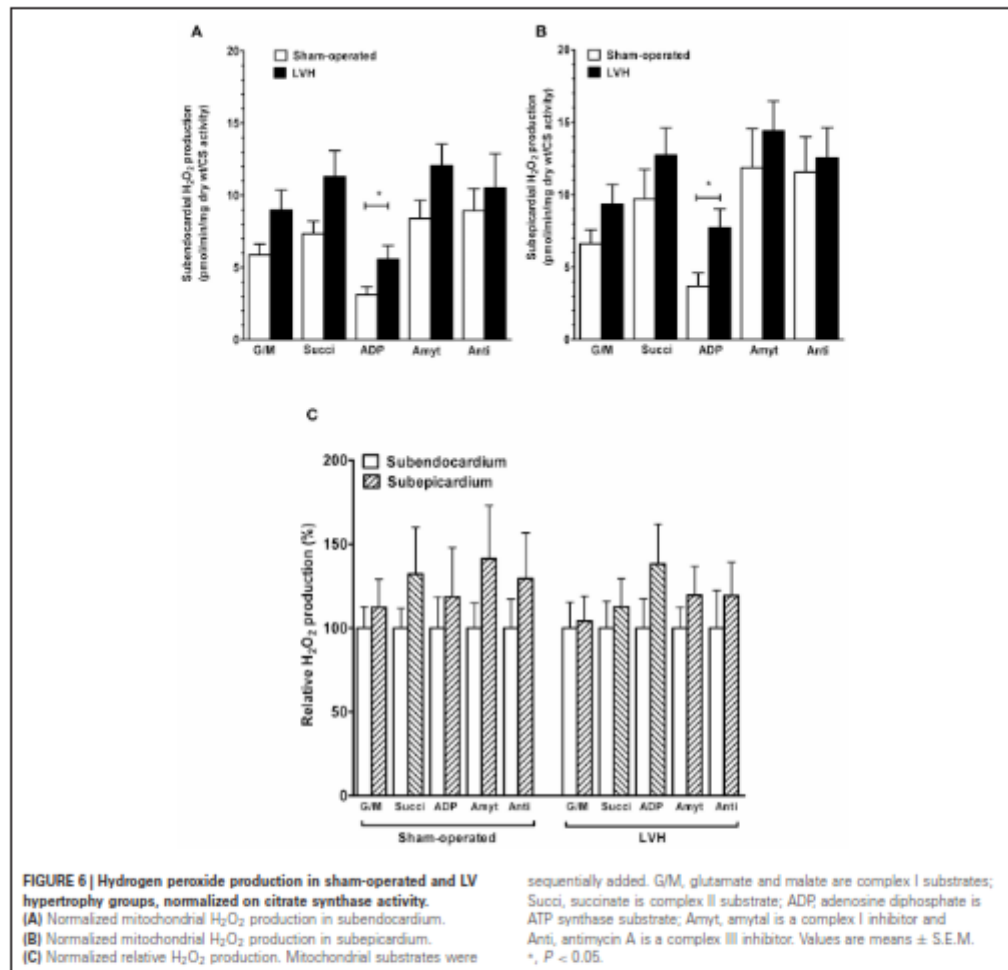
However, few data exist concerning the existence of an energetic gradient across the LV wall. Previous studies using isolated mitochondria showed either similar oxidative capacity in Endo and Epi (Whitty et al., 1976) or increased capacity in Endo (Camici et al., 1984). Respiration studies using isolated mitochondria might result in conflicting results, particularly in the case of small differences, because of non-homogeneity and fragility of mitochondria submitted to isolation procedures (Sharov et al., 1998). Such limitation might potentially be overcome by using saponin-skinned fibers that ensure global mitochondrial function assessment in intact mitochondria. MacDonald et al. recently investigated transmural differences in respiratory capacity across LV and no transmural respiratory difference was observed in healthy rats (MacDonald et al., 2011). These data are in opposition with our results. Similar techniques and animals were used in both studies and further investigations will be useful to clearly explain such a discrepancy.

Indeed, we clearly observed that subendocardial oxidative capacity was significantly lower than subepicardial capacity. These differences hold true for complexes I, III, and IV of the mitochondrial respiratory chain. A key factor that might have been involved in our results is increased ROS production in Endo. Indeed, high oxidative stress has been related to mitochondrial dysfunction in several settings including ischemia-reperfusion and PO (Ingwall, 2009; Charles et al., 2011). Nevertheless,  $H_2O_2$  overproduction in Endo was not observed, the relative  $H_2O_2$  production being









similar in both IV layers. Similar data were observed in LVH, further supporting that hydrogen peroxide did not explain the transmural gradient seen in mitochondrial respiration.

**MILD CARDIAC HYPERTROPHY IMPAIRS SUBENDOCARDIAL AND SUBEPICARDIAL MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX ACTIVITIES**

Surprisingly, increased maximal oxidative capacity was transiently observed using isolated mitochondria in a thoracic aortic banding model. In this study, maximal respiratory capacity was greater than control in the first 6 weeks, normal after 10 weeks and significantly reduced after 20 weeks (Doenst et al., 2010). This might correspond to a first compensated phase,

mitochondrial dysfunction occurring thereafter when ejection fraction was decreasing. Accordingly, it is generally accepted that mitochondrial dysfunction is observed at the stage of heart failure (Ventura-Clapier et al., 2001). In particular, energetic impairment has been reported when LVH is associated with cardiac dysfunction (Ventura-Clapier et al., 2001; Ali et al., 2011). A decreased rate of substrate oxidation predicts the onset of contractile dysfunction and heart failure in rats with PO (Neubauer, 2007; Jameel and Zhang, 2009; Doenst et al., 2010). However, whether mitochondrial dysfunction might be differently involved in endocardium as compared to epicardium during PO-induced mild cardiac hypertrophy development deserve further studies.

In the present work, for the first time, we observed that mitochondrial respiratory chain complex activities are significantly reduced in both the subendocardial and subepicardial LV layers in compensated LVH. This might be clinically relevant since our model of 6 weeks abdominal aortic banding induced an increase in LV mass of 31.7% with no clinical signs of heart failure and no changes in LVEDP, LV diameter, LV ejection fraction, LV fractional shortening, or IVRT. Furthermore, we used saponin-permeabilized fibers, which allow the determination of global mitochondrial function with respect to the mitochondrial architectural environment (Zoll et al., 2002). Similarly, MacDonald et al. also recently reported an early impairment in mitochondrial respiration in streptozotocin-induced diabetes (MacDonald et al., 2011).

Although mitochondrial uncoupling should not always be seen as deleterious (Duteil et al., 2010; Tran et al., 2012), besides mitochondrial respiratory chain activities impairment, PO might be associated with mitochondrial uncoupling particularly in case of heart failure. Accordingly, Faerber et al. observed not only reduced respiratory rates but also reduced mitochondrial coupling in mice hearts after aortic banding performed between the brachiocephalic trunk and the left carotid artery (Faerber et al., 2011). Thus, a loss of efficiency in ATP production was observed both in the failing hearts and in cardiac hypertrophy without heart failure. In our study, at a global muscle level, we did not observe mitochondrial uncoupling. The smaller degree of LVH in our rats likely explains their maintained mitochondrial coupling.

#### **MILD CARDIAC HYPERTROPHY IS ASSOCIATED WITH INCREASED MITOCHONDRIAL HYDROGEN PEROXIDE PRODUCTION AND FREE RADICAL LEAK**

Excessive ROS generation likely participates in cardiac hypertrophy-associated mitochondrial damage (Pimentel et al., 2001; Seddon et al., 2007; Takimoto and Kass, 2007), and the sources of ROS production during cardiac hypertrophy deserve further investigation. Uncoupled nitric oxide synthetase, xanthine oxidoreductase, and NADPH oxidase might be important mediators of PO-induced LVH. However, a role of mitochondria in generating ROS in the setting of cardiac hypertrophy is also likely (Seddon et al., 2007). Indeed, the role of mitochondria extends far beyond energy production because mitochondria are important generators of ROS that can act as a source of cellular damage depending on the amount of ROS produced (Bouitbir et al., 2011).

Mitochondria are both causes and targets of ROS, and mitochondrial production of  $H_2O_2$  might be increased as a result of LVH-associated mitochondrial dysfunction. The use of saponin-permeabilized fibers allowed us to study  $H_2O_2$  production by mitochondria. The data thus obtained support the idea that mitochondria participate significantly in hypertrophy-related oxidative stress. Indeed, subendocardial and subepicardial  $H_2O_2$  production was significantly enhanced in LVH compared to normal hearts. Accordingly, the free radical leak increased in LVH, supporting that the fraction of electrons which reduce  $O_2$  to ROS in the respiratory chain (Anderson et al., 2009; Bouitbir et al., 2012) was greater in

pressure-overloaded hearts. This was observed in Endo and Epi and thus mitochondria located in both LV layers participated in the ROS overproduction of the hypertrophied hearts.

#### **MILD CARDIAC HYPERTROPHY IS ASSOCIATED WITH A DECREASED TRANSMURAL GRADIENT IN MITOCHONDRIAL RESPIRATORY CHAIN COMPLEX IV ACTIVITY**

Interestingly, transmural complex IV activity was significantly reduced in LVH as compared to sham animals. Cardiac hypertrophy reduced such LV transmural gradient mainly through a decrease in subepicardial mitochondrial respiration.

A similar result has been reported during dobutamine-induced demand ischemia. Indeed, Jameel et al. observed in a stenotic perfused coronary bed during dobutamine-induced high cardiac work state, that the Epi showed greater metabolic changes than the Endo layer (Jameel et al., 2008). Although both settings were different, these two results might suggest that the sensitivity of the LV Epi layer might be increased in case of pre-existing pathology as compared to normal LV submitted to recent injury.

Whether mitochondrial dysfunction is not a major causative factor in the eventual failure of the LV cannot be inferred from our data since our model was not characterized by heart failure. Nevertheless, one might propose that the relatively light degree of LVH explains that only complex IV activity of the mitochondrial respiratory chain was significantly reduced as compared to sham heart. Further studies would be useful to determine whether greater LVH with beginning cardiac failure will be associated with a reduced LV transmural differences in all mitochondrial respiratory chain complexes activities. In this case, such a reduced transmural mitochondrial respiratory gradient might be a new marker of the transition from uncomplicated to complicated LVH.

#### **INCREASED SUBENDOCARDIAL AND SUBEPICARDIAL MITOCHONDRIAL CONTENT IN CARDIAC HYPERTROPHY**

It has been generally reported a reduced mitochondrial biogenesis in case of LVH, but mainly in case of decompensated pathological hypertrophy. Accordingly, Abel and Doenst recently proposed that mitochondrial biogenesis might be enhanced or maintained during physiological or compensated pathological hypertrophy, respectively (Abel and Doenst, 2011). In our study, the global mitochondrial content in tissues increased but mitochondrial oxidative capacity decreased concomitantly. Thus, as expected, our model likely allowed to explore LVH located just before a decompensated state.

Data can be normalized on CS in an attempt to view the results not as a whole but as data per unit of mitochondria. However, in this study, we performed citrate synthase analysis as additional measurements. Fibers were not the same than those used for mitochondrial respiration or  $H_2O_2$  production, possibly decreasing the pertinence of such analysis. Accordingly, study normalizing respiration on citrate synthase used frozen myofibers bundles from respiratory assays (Picard et al., 2011). Despite this technical limitation, to discuss normalized data on CS activity appears interesting.

Considering both normal heart and LVH, the data obtained without normalization are globally confirmed. Thus, differences were amplified for respiration and reduced for  $H_2O_2$ . To overcome the limitation related to the use of different fibers for  $H_2O_2$  production and CS measurements, we determined the free radical leak, allowing determine mitochondrial ROS production on same fibers, matching respiration values with matched substrates. Such analysis confirmed that ROS originating from mitochondria were increased in LVH.

Concerning a potential transmural gradient in ROS production in normal heart, all analysis demonstrated no difference between Endo and Epi layers. This held true in LVH and supports that hydrogen peroxide does not explain the normal transmural gradient seen in respiration. Concerning the complex IV activity transmural gradient difference between normal heart and LVH, the statistical significance was lost when normalizing it on CS activity. This suggest caution in the interpretation of the data, as presented below.

#### LIMITATIONS OF THE STUDY

In case of obesity, an increased effect of blood pressure has been observed on LV growth resulting in a steeper slope of the blood pressure-IV mass index relation (Norton et al., 2009). Impaired pathways controlling cellular growth and proliferation appeared to be related to increased oxidative stress (Mandavia et al., 2012) and dietary-induced obesity has been shown to hasten the progression from concentric LV hypertrophy to pump dysfunction in SHR rats (but not in WKY control rats), independently of blood pressure changes (Majane et al., 2009). Since our animal weights were located at the upper limit of the normal range, it is possible that pressure-overload effects might have been enhanced as compared to animals with lower body weight.

Only part of the transmural difference in mitochondrial respiratory chain complex activities seen across the normal left

ventricle was decreased in LVH. Since the statistical significance was lost when normalizing on citrate synthase activity, it might be viewed as no physiologically important. We believe that this is likely to be due to the relatively small degree of LVH in our experimental model and that even a small transmural difference might be pertinent. Indeed, keeping on mitochondrial function, for instance, very slight mitochondrial uncoupling of about 12% has been shown to be beneficial, protecting mice against decreased muscle oxidative capacities induced by sedentariness, development of type 2 diabetes and against high-caloric diet induced obesity (Duteil et al., 2010).

In summary, our data support a transmural difference in mitochondrial respiratory chain complex activities across the normal left ventricle, with a lower oxidative capacity of the Endo as compared to the Epi.

PO-induced mild cardiac hypertrophy was characterized by reduced mitochondrial respiratory chain complex activities associated with increased hydrogen peroxide production.

Additionally, cardiac hypertrophy might be associated with a decreased transmural gradient in mitochondrial respiratory chain complex IV activity. To determine whether these changes may be a hallmark in LVH time course needs further work aiming to investigate whether maladaptive hypertrophy is associated with a loss of LV transmural energetic gradient.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Fabienne Goupilleau, Isabelle Bentz, Anne-Marie Medina, and Anne Schmitt for their expert biological and secretarial assistance. We are grateful to the Professor N. Meyer, from the department of Public Health, for his assistance in the statistical analysis of the data.

#### FUNDING

This work was supported by a grant from OCOVAS ("Cardiovascular operated patients association").

#### REFERENCES

- Abel, E. D., and Doemt, Y. (2011). Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* 90, 334–342.
- Ali, A., Patel, A., Ali, Z., Abu-Omar, Y., Saad, A., Athanasios, T., and Pepper, J. (2011). Enhanced left ventricular mass regression after aortic valve replacement in patients with aortic stenosis is associated with improved long-term survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 142, 285–291.
- Anderson, E. J., Kypson, A. P., Rodriguez, E., Anderson, C. A., Lehr, E. J., and Neufer, P. D. (2009). Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. *J. Am. Coll. Cardiol.* 54, 1891–1896.
- Anderson, E. J., and Neufer, P. D. (2006). Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial  $H_2O_2$  generation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290, C844–C851.
- Boulibir, J., Charles, A. L., Echaniz-Laguna, A., Kindo, M., Dausin, P., Auverex, J., Piquard, P., Gony, B., and Zoll, J. (2011). Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1. *Eur. Heart J.* 33, 1397–1407.
- Boulibir, J., Dausin, P., Charles, A. L., Rasseneur, L., Dufour, S., Richard, R., Piquard, P., Gony, B., and Zoll, J. (2012). Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins. *Muscle Nerve*. doi: 10.1002/mus.23309
- Buckberg, G., Hoffman, J. I., Mahajan, A., Saleh, S., and Coghlan, C. (2008). Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function. *Circulation* 118, 2571–2587.
- Camici, P., Ursini, F., Galazzo, F., Bellitto, L., Pelosi, G., Marzilli, M., L'Abbate, A., and Barsacchi, R. (1984). Different respiratory activities of mitochondria isolated from the subendocardium and subepicardium of the canine heart. *Basic Res. Cardiol.* 79, 454–460.
- Cantor, E. J., Babick, A. P., Vasanthi, Z., Dhalla, N. S., and Netticadan, Y. (2005). A comparative serial echocardiographic analysis of cardiac structure and function in rats subjected to pressure or volume overload. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38, 777–786.
- Canorla, O., Szilagyi, S., Le Guennec, J. Y., Vassort, G., and Lacampagne, A. (2005). Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction. *FASEB J.* 19, 88–90.
- Charles, A. L., Guilbert, A. S., Boulibir, J., Goette-Di Marcos, P., Enache, I., Zoll, J., Piquard, P., and Gony, B. (2011). Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping. *Br. J. Surg.* 24, 511–516.
- Doemt, Y., Pytel, G., Schreppler, A., Amorim, P., Farber, G., Shingu,



- Y, Mohr, F. W., and Schwarzer, M. (2010). Decreased rates of substrate oxidation *ex vivo* predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc. Res.* 86, 461–470.
- Drazner, M. H. (2011). The progression of hypertensive heart disease. *Circulation* 123, 327–334.
- Duncker, D. J., and Bache, R. J. (2008). Regulation of coronary blood flow during exercise. *Physiol. Rev.* 88, 1009–1086.
- Dutoit, D., Chambon, C., Ali, F., Malvindi, R., Zoll, J., Kato, S., Gony, B., Chambon, P., and Metzger, D. (2010). The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles. *Cell Metab.* 12, 496–508.
- Faerber, G., Barreto-Pereira, F., Schoepe, M., Gilbach, R., Schreyer, A., Schwarzer, M., Mohr, F. W., Hein, L., and Doentz, Y. (2011). Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator levels and mitochondrial dysfunction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 141, 492–500.
- Gallego-Delgado, J., Lazaro, A., Ordoñez, J. I., Barderas, M. G., Duran, M. C., Vivanco, F., and Egido, J. (2006). Comparison of the protein profile of established and regressed hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *J. Proteome Res.* 5, 404–413.
- Geshi, E., Konno, N., Yanagishita, Y., and Katagiri, Y. (1988). Impairment of mitochondrial respiratory activity in the early ischemic myocardium—with special reference to electron transport system. *Jpn. Circ. J.* 52, 535–542.
- Griffiths, E. R., Priebs, I., Scherr, E., Postulas, D., McGowan, F. X., and Del Nido, P. J. (2010). Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 139, 1609–1617.
- Ingwall, J. S. (2009). Energy metabolism in heart failure and remodeling. *Cardiovasc. Res.* 81, 412–419.
- Jameel, M. N., Wang, X., Eljoghshoven, M. H., Mansoor, A., and Zhang, J. (2008). Transmural distribution of metabolic abnormalities and glycolytic activity during dobutamine-induced demand ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 295, H2680–H2686.
- Jameel, M. N., and Zhang, J. (2009). Myocardial energetics in left ventricular hypertrophy. *Curr. Cardiol. Rev.* 5, 243–250.
- Kuznetsov, A. V., Veksler, V., Gellerich, F. N., Saka, V., Margreiter, R., and Kunz, W. S. (2008). Analysis of mitochondrial function *in situ* in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* 3, 965–976.
- Lou, Q., Fedorov, V. V., Glukhov, A. V., Moazami, N., Past, V. G., and Efimov, I. R. (2011). Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure. *Circulation* 123, 1881–1890.
- MacDonald, J. R., Oellermann, M., Rybeck, S., Chang, G., Ruggiero, K., Cooper, G. J., and Hickey, A. J. (2011). Transmural differences in respiratory capacity across the rat left ventricle in health, aging, and streptozotocin-induced diabetes mellitus: evidence that mitochondrial dysfunction begins in the subepicardium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C246–C255.
- Majane, O. H., Vengathasamy, L., du Toit, E. P., Makaula, S., Woodiwis, A. J., and Norton, G. R. (2009). Dietary-induced obesity hastens the progression from concentric cardiac hypertrophy to pump dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 54, 1376–1383.
- Mandavia, C. H., Pulakat, L., Demarco, V., and Sowers, J. R. (2012). Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy. *Metab. Clin. Exp.* doi: 10.1016/j.metabol.2012.02.015
- Murdoch, C. E., Zhang, M., Cave, A. C., and Shah, A. M. (2006). NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodeling and failure. *Cardiovasc. Res.* 71, 208–215.
- Nabeebaccus, A., Zhang, M., and Shah, M. A. (2011). NADPH oxidase and cardiac remodeling. *Heart Fail. Rev.* 16, 5–12.
- Neubauer, S. (2007). The failing heart—an engine out of fuel. *N. Engl. J. Med.* 356, 1140–1151.
- Norton, G. R., Majane, O. H., Libhaber, E., Maseko, M. J., Makaula, S., Libhaber, C., and Woodiwis, A. J. (2009). The relationship between blood pressure and left ventricular mass index depends on an excess adiposity. *J. Hypertens.* 27, 1873–1883.
- Opie, L. H., Commerford, P. J., Gersh, B. J., and Pfeffer, M. A. (2006). Controversies in ventricular remodeling. *Lancet* 367, 356–367.
- Picard, M., Rüchic, D., Thomas, M. M., Wright, K. J., and Hepple, R. Y. (2011). Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles. *Aging Cell* 10, 1047–1055.
- Pimentel, D. R., Amin, J. K., Xiao, L., Miller, Y., Vireck, J., Olszewski, J., Baliga, R., Wang, J., Siwik, D. A., Singh, K., Pagano, P., Colucci, W. S., and Sawyer, D. B. (2001). Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 89, 455–460.
- Rimbaud, S., Sanchez, H., Garnier, A., Fortin, D., Bigard, X., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2009). Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 46, 952–959.
- Seldon, M., Looi, Y. H., and Shah, A. M. (2007). Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart* 93, 903–907.
- Sengupta, P. P., Korinek, J., Belohlavek, M., Narula, J., Vannan, M. A., Jhangir, A., and Khandheria, B. K. (2006). Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48, 1988–2001.
- Sharov, V. G., Goussev, A., Lesch, M., Goldstein, S., and Sabbah, H. N. (1998). Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30, 1757–1762.
- Smith, S. H., Kramer, M. F., Reis, I., Bishop, S. P., and Ingwall, J. S. (1990). Regional changes in creatine kinase and myocyte size in hypertensive and nonhypertensive cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 67, 1334–1344.
- Sonntag, M., Deussen, A., Schultz, J., Loncar, R., Hort, W., and Schrader, J. (1996). Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity. *Pflügers Arch.* 432, 439–450.
- Steele, P. A. (1969). Citrate synthase. *Methods Enzymol.* 13, 3–11.
- Takimoto, E., and Kass, D. A. (2007). Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. *Hypertension* 49, 241–248.
- Fran, Y. N., Noll, E., Collinge, O., Bouibir, J., Charles, A. L., Kindo, M., Zoll, J., Diemunsch, P., and Gony, B. (2012). Mitochondrial respiratory chain uncoupling, oxidative stress and skeletal muscle energetics. *Skeletal Muscle Physiol. Clin. Physiol.*
- Van Bilsen, M., Van Nieuwenhoven, F. A., and Van der Vusse, G. J. (2009). Metabolic remodeling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.* 81, 420–428.
- Van der Welden, J., Merkus, D., de Beer, V., Hamdani, N., Linke, W. A., Boontje, N. M., Stienen, G. J., Duncker, D. J. (2011). Transmural heterogeneity of myofibrillar function and sarcomeric protein phosphorylation in remodeled myocardium of pigs with a recent myocardial infarction. *Front. Physiol.* 2:83. doi: 10.3389/fphys.2011.00083
- Wal, E. A., Day, A. M., and Morgan, B. A. (2007). Hydrogen peroxide sensing and signalling. *Mol. Cell* 26, 1–14.
- Veksler, V. I., Kuznetsov, A. V., Sharov, V. G., Kapelko, V. I., and Saka, V. A. (1987). Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers. *Biochim. Biophys. Acta* 892, 191–196.
- Ventura-Clapier, R., Garnier, A., Veksler, V., and Jouber, F. (2001). Bioenergetics of the failing heart. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 1360–1372.
- Whitty, A. J., Dimino, M. J., Elfont, E. A., Hughes, G. W., and Repeck, M. W. (1976). Transmural mitochondrial differences in myocardium. *Recent Adv. Stud. Cardiac Struct. Metab.* 11, 349–354.
- Zoll, J., Monassier, L., Garnier, A., N'Goussan, B., Mettauer, B., Veksler, V., Piquard, F., Ventura-Clapier, R., and Gony, B. (2006). ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J. Appl. Physiol.* 101, 385–391.
- Zoll, J., Ponsot, E., Dautrevaux, S., Mettauer, B., Piquard, F., Mazzacotelli, J. P., Diemunsch, P., and Gony, B. (2005). Acute myocardial ischemia induces specific alterations of ventricular mitochondrial function in experimental pigs. *Acta Physiol. Scand.* 165, 25–32.
- Zoll, J., Sanchez, H., N'Goussan, B., Ribera, P., Lampert, E., Bigard, X., Serrurier, B., Fortin, D., Gony, B., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., and Mettauer, B. (2002). Physical

activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle. *J. Physiol.* 543, 191–200.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships

that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 23 April 2012; accepted: 29 July 2012; published online: 28 August 2012.

Citation: Kindo M, Gerelli S, Boutbir J, Charles A-L, Zoll J, Hoang Minh T, Monassier L, Farret F, Piquard F and Geny B (2012) Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy

reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress. *Front. Physiol.* 3:332. doi: 10.3389/fphys.2012.00332

This article was submitted to *Frontiers in Cardiac Muscle Physiology*, a specialty of *Frontiers in Physiology*.

Copyright © 2012 Kindo, Gerelli, Boutbir, Charles, Zoll, Hoang Minh,

Monassier, Farret, Piquard and Geny. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

## 3.7 Evaluation de la Fonction mitochondriale dans un cœur en décharge ventriculaire

### 3.7.1 Design expérimental – introduction

Dans le but d'évaluer l'adaptation du métabolisme énergétique myocardique face au travail, nous avons placé des cœurs de rats « Wistar », âgés de 12 semaines en décharge ventriculaire. L'objectif était de déterminer la réponse de la fonction mitochondriale et la production de stress oxydant sur un cœur sans contrainte pariétale.

### 3.7.2 Matériel et méthode

Pour ce faire 28 rats « Wistar » non-isogéniques ont été utilisés pour réaliser 14 transplantations cardiaque. Le protocole de transplantation cardiaque hétérotopique était le suivant. Un premier animal était anesthésié dans une cage d'induction sous isoflurane. Son cœur était prélevé après une cardioplégie au Celsior® à 4°C par voie rétrograde après avoir lié les veines caves et déchargé les cavités gauches. Ensuite, les veines pulmonaires étaient également liées. Le cœur prélevé était préservé dans le soluté de conservation, le temps d'anesthésier et de préparer le rat suivant. Une laparotomie transverse était pratiquée, avec un contrôle de l'aorte et de la veine cave sous rénale. Le cœur du donneur était anastomosé au Prolène 9/0 par une anastomose termino-latérale, entre l'aorte du donneur et du receveur ainsi qu'entre l'artère pulmonaire du donneur et la veine cave du receveur. Le protocole de transplantation correspond à la technique décrite par Hasegawa et al. [151].

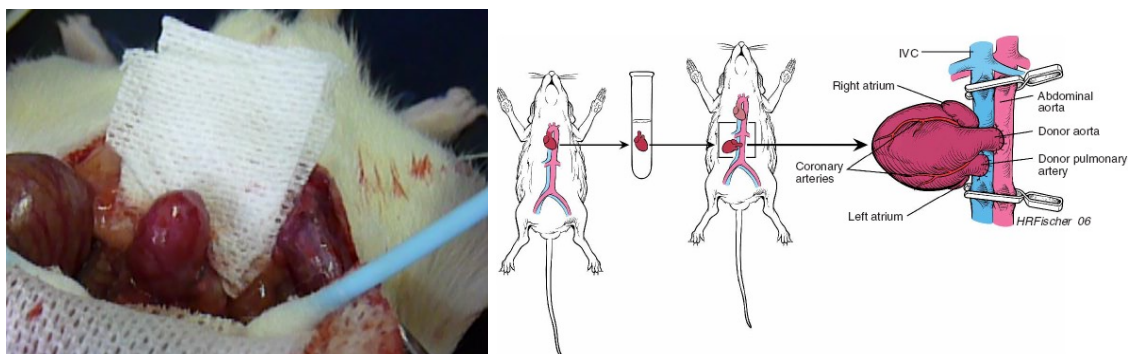


Figure 15 - Photographie d'un cœur greffé en position hétérotopique (photographie de gauche) et technique schématique selon Hasegawa et al (schéma de droite).

Les 14 rats qui ont bénéficié de la transplantation cardiaque hétérotopique ont été maintenus en vie durant 3 semaines. Il y a eu 7 cœurs transplantés pour lesquels un



mécanisme de rejet est apparu, avec fibrose et thrombose du cœur greffé. Les 7 cœurs en décharge restant ont été contrôlés par une échographie cardiaque, retrouvant pour certains une insuffisance aortique avec un flux systolo-diastolique, et pour d'autre un foramen ovale perméable. Ainsi, nous ne pouvons pas considérer que les cœurs transplantés étaient en décharge complète, entre le retour par le sinus veineux coronaire (via le foramen ovale) et l'insuffisance aortique. Néanmoins, les pressions télé-diastolique de remplissage restaient basses (<10mmHg). A la 3<sup>ème</sup> semaine les cœurs et le VG ont été prélevés, pesés et analysés. Seul l'analyse de la fonction de la respiration mitochondriale des cœurs greffés a pu être réalisée.

Afin d'éviter tout biais, nous n'avons pas pu comparer les résultats du métabolisme oxydatif des cœurs en décharge par rapport au cœur sain en charge, n'ayant pas prélevé le cœur des rats receveurs. Par ailleurs, la mesure de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produite n'a pas été réalisée, seule l'analyse de la chaîne de respiration mitochondriale entre l'Endo et Epi a été pratiquée selon la technique des fibres musculaires perméabilisées par la saponine [111].

### 3.7.3 Résultats et Discussion

Les données de la respiration mitochondriale n'ont été exploitées que sur 6 cœurs, après 3 semaines de décharge ventriculaire partielle, l'un d'entre eux n'ayant pas respiré sans que nous ayons d'explication. Il n'a pas été observé de différence significative, que ce soit pour le complexe I, II III ou IV de la chaîne respiratoire mitochondriale, entre les couches musculaires Endocardique et Epicardique sur le myocarde. Ces résultats suggèrent que sans contrainte mécanique sous- endocardique il n'y a plus de gradient énergétique. L'interprétation de ces données suggère que sans stress pariétal sous- endocardique, il n'y a plus d'altération de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ainsi, nous pourrions considérer que la fonction respiratoire mitochondriale est inversement proportionnelle au stress mécanique. Il faut toutefois rester prudent sur cette analyse, face à l'absence de décharge complète du ventricule gauche. Par ailleurs, sachant qu'il ne s'agissait pas de rat isogénique il est probable qu'un début de réponse immunologique puisse avoir lieu et interfère avec nos résultats.

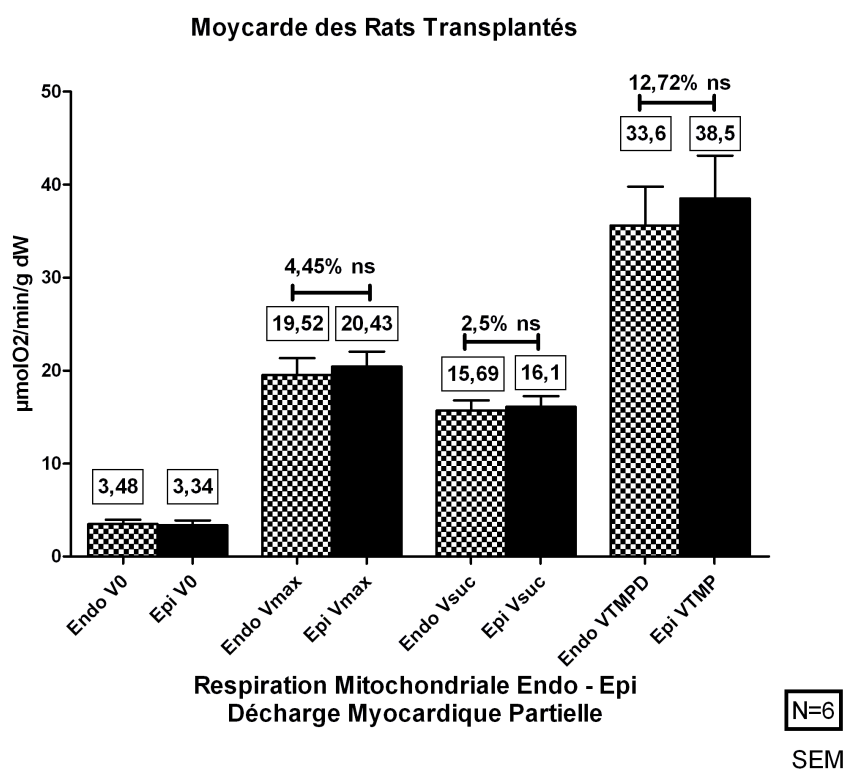


Figure 16 - Données de la respiration mitochondriale par unité de poids, des différents complexes de la chaîne respiratoire sur un cœur de rat en décharge ventriculaire. Les histogrammes hachurés représentent les mitochondries des cardiomyocytes endocardiques et les histogrammes noirs celles des cardiomyocytes épicaudiques.

### 3.8 Les prémices de la conception d'un tube pulsatile

Après notre étude sur le métabolisme énergétique du muscle cardiaque au repos, soumis à un stress et en décharge, comme nous le verrons dans notre discussion, des mécanismes et des cibles thérapeutiques se dessinent afin d'optimiser le rendement énergétique d'un cœur univentriculaire. Notre dernière approche énergétique musculaire pour suppléer d'une part et optimiser d'autre part, la fonction d'un ventricule unique, est de créer un tube pulsatile visant à restituer une pompe pulmonaire. L'objectif est d'obtenir un débit cardiaque de repos, d'assurer une tolérance à l'effort, et bien sûr de limiter les complications d'une circulation de Fontan à long terme.

Ces études pilotes sont essentiellement un travail préliminaire destiné à déterminer la faisabilité de ce programme ambitieux. La première étude in-vivo a consisté à déterminer la faisabilité technique de la conception d'un tube pulsatile extracardiaque avec le muscle grand

dorsal chez l'ovine. La seconde étude ex-vivo, a consisté à déterminer la capacité d'un tube valvé à générer un débit pulsé.

### 3.8.1 Conception d'un tube pulsatile : Modèle In vivo

#### 3.8.1.1 Méthodologie :

Pour réaliser cette procédure nous avons utilisé un tube valvé Contegra<sup>®</sup> de 22 mm de diamètre. Afin de lui donner des propriétés mécaniques avec une compliance, il a été fixé un stent à mémoire de forme au prolène, sur la paroi extérieure du tube en amont de la valve.

Chez un ovine nous avons prélevé le lambeau pédiculé du muscle grand dorsal droit que nous avons ensuite tunnélisé dans le troisième espace inter-costale droit.

Nous avons évalué ex-vivo la fraction de raccourcissement du tube avec le stent en stimulant le muscle grand dorsal. Le degré de raccourcissement du tube était calibré sur une bougie de Hegar.

Il a été réalisé, comme décrit ci-dessus, chez un ovine une dérivation cavo atriale supérieure au dépend de l'auricule droit. Cet artifice technique nous a permis ensuite de procéder à une dérivation cavo-cave en anastomosant la veine cave inférieure au tube de Contegra<sup>®</sup> préalablement préparé, lui-même anastomosé à la veine cave supérieure en termino-terminale, tout en garantissant le survie de l'animal.

Le lambeau du muscle grand-dorsal droit a été placé sur le pourtour du stent à mémoire de forme et fixé par des points séparés sur le tube valvé.

Des électrodes de stimulation externe ont été placées sur le lambeau musculaire puis stimulé à diverses fréquences avec un ampérage maximal de 10 mA par un stimulateur externe.

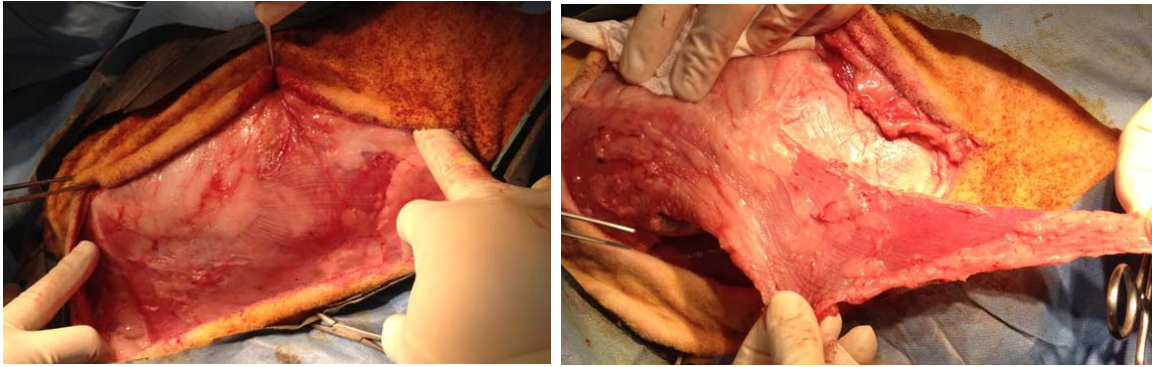


Figure 17 - Prélèvement du muscle grand dorsal droit en lambeau pédiculé



Figure 18 -Evaluation in-vivo la fraction de raccourcissements du tube monté sur un stent à mémoire de forme.

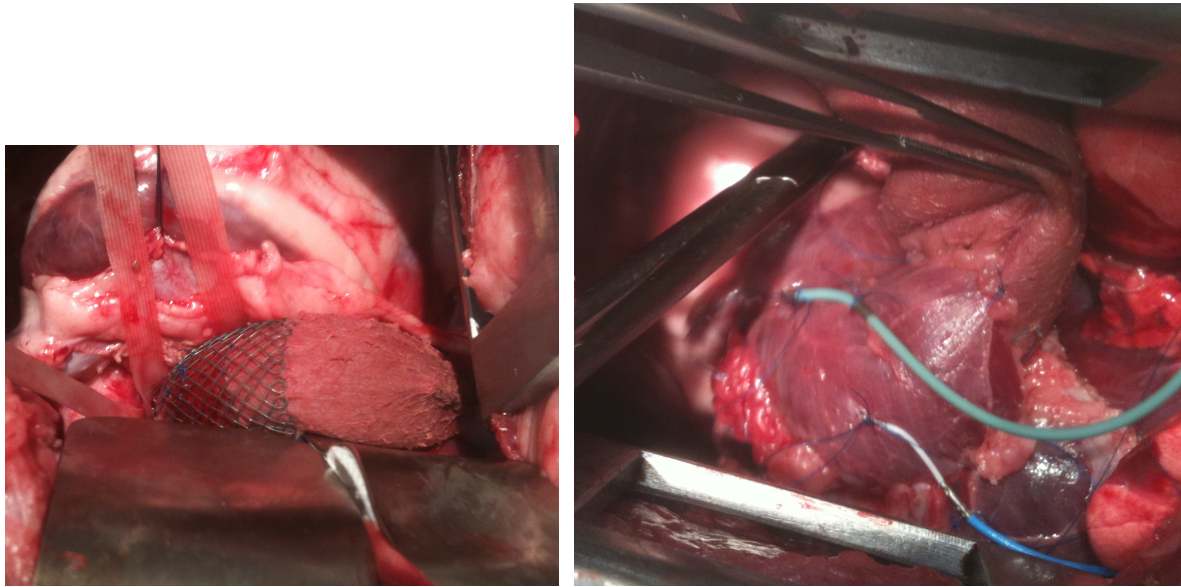


Figure 19 - Anastomose cavo-cave avec interposition du tube Contegra<sup>®</sup> de 22 mm, incorporé dans un stent à mémoire de forme, sur lequel est disposé circulairement le muscle grand dorsal.

### 3.8.1.2 Résultats – Discussion

La fraction de raccourcissement du tube a été évaluée approximativement à 20%.

En position In-vivo, nous avons observé pendant 5 minutes une bonne contractilité macroscopique du muscle grand dorsal, sans pour autant évaluer un débit sanguin. Au-delà, le muscle s'est épuisé.

Ce résultat ne préjuge en rien de la capacité fonctionnelle de cet artifice chirurgical à assurer un débit pulmonaire, ni de la possibilité d'assurer à long terme sa fonction. Néanmoins, nous validons pour la première fois la possibilité technique de concevoir un tube pulsatile biologique via le muscle grand dorsal pédiculé.

Cette étude de faisabilité, nous a permis de définir l'ensemble des problématiques que nous devons résoudre avant de continuer. Elaborer un protocole de pré-conditionnement musculaire efficient, définir la disposition des fibres musculaires sur le tube afin d'obtenir la contractilité la plus efficace possible, trouver le meilleur support au muscle pour assurer d'une part, son adhérence, et d'autre part garantir un relâchement musculaire sans contrainte, et enfin la nécessité d'élaborer une valvulation d'amont et d'aval.

Avant de répondre à toutes ces interrogations, nous avons cherché à déterminer si un tel dispositif permettrait d'assurer un débit cardiaque dans des conditions physiologiques. Nous avons donc conceptualisé un model ex-vivo.

### 3.8.2 Conception d'un tube pulsatile Modèle Ex vivo

En effet, une des problématiques fondamentales d'un tel dispositif, est sa capacité à générer un débit pulmonaire d'environ 4 à 5L/min. Si l'on fait abstraction des propriétés inotropes du muscle grand dorsal, de sa fréquence de contraction, le seul paramètre qui permettra d'assurer le débit est le volume d'éjection systolique (VES).

Partant des prémices suivantes, un tube de Gore-Tex<sup>®</sup> de 16 cm de long et d'un diamètre de 20 mm, son volume est d'environ 50 ml. Ainsi, en supposant une relaxation parfaite du tube assuré par le stent à mémoire de forme (définissant ses propriétés lusitropes), à une fréquence à 70 contractions par minute, le débit théorique, si la contraction est de 100% sur toute la hauteur du tube, est de 3,5L/min maximum.

Nous avons donc élaboré un modèle ex-vivo pour déterminer si les propriétés lusitropes de notre stent à mémoire de forme étaient adaptées d'une part, et d'autre part de la nécessité de réaliser une double valvulation du tube, eu égard au régime de pressions modérées de la circulation pulmonaire.

Compte tenu de la loi de Poiseuille définissant le débit, comme le rapport des différences de pression entre la sortie et l'entrée, rapporté sur les résistances vasculaires, nous avons élaboré un modèle empirique depuis un circuit de circulation extracorporelle (CEC). Considérant que notre écoulement dans un tubing de CEC de 3/8<sup>ème</sup> est laminaire et que la viscosité de notre soluté est équivalente à celle du sang (Dilution à l'eau d'une solution hydro-alcoolique), seule la hauteur de notre cardiote, placé à 15 cm du sol, reproduit le gradient de pression transpulmonaire et donc les résistances du circuit.

Ainsi, le débit généré par notre tube stenté dépendra essentiellement du VES défini par la précharge, le fonctionnement de la pompe, et la post-charge. L'action mécanique de la pompe sera assurée manuellement à 70 contractions par minute et la post-charge par la hauteur du cardiote et de la viscosité sanguine. Ainsi, sur ce modèle seul l'effet de la précharge sera pris en compte. La précharge étant définie par l'ensemble des facteurs qui contribuent à créer la contrainte s'exerçant sur la paroi, le débit obtenu par notre modèle fermé, dépendra de la volémie, et de la compliance du tube stenté, représentant les contraintes pariétales ou tension pariétale définie par la loi de la Place.

Une première expérience a été faite uniquement avec un tube valvé et stenté à son orifice d'entrée, et une deuxième expérience avec une double valvulation entrée et sortie. Les valves utilisées étaient des valves mécaniques St Jude N° 19. Le circuit était clos et le débit mesuré en continu.

### 3.8.2.1 Résultats – Discussion

Le débit généré avec une seule valve ne dépassait pas 1,5 L/min.

Le débit généré par un montage avec une double valvulation entrée et sortie était de 2L/min.

Ainsi nous pouvons conclure qu'un tube extracardiaque de Fontan n'a pas la possibilité d'assurer un débit pulmonaire physiologique. Notre stent à mémoire de forme couplé sur un tube de Gore-Tex® n'a pas l'effet lusitrope requis pour garantir une compliance optimale. Ainsi, nous ne pourrions obtenir un débit physiologique qu'au prix d'une double valvulation et de trouver un substitut biologique ou synthétique capable d'améliorer notre courbe pression – volume dans les conditions anatomiques que l'on connaît.

A l'heure actuelle qu'elle que soit la fonction de la pompe, mécanique (C Pulse Assist) ou biologique (grand-dorsal) agissant sur un tube extracardiaque de Fontan, elle ne peut produire qu'un débit pulsé infra-physiologique, au prix d'une double valvulation, et au risque de créer une perte de charge énergétique à l'écoulement des fluides.

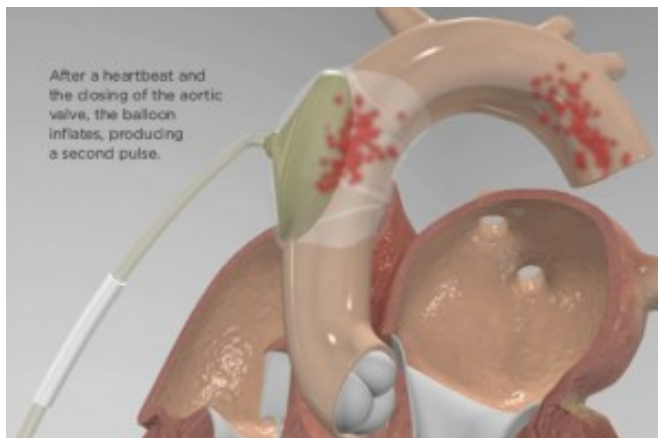


Figure 20 - C-Pulse Heart Assist : dispositif d'assistance pneumatique aortique.

Photo d'une assistance pneumatique mécanique.



## Quatrième partie

## 4 Discussion et Perspectives

### 4.1 La chirurgie hybride

Les résultats cliniques actuels des dérivations cavo-pulmonaires totales (DCPT) par voie percutanée n'ont pas fait la preuve de leur supériorité par rapport au gold standard qui reste la chirurgie [37, 40-44]. De nombreuses complications à court et moyen terme sont survenues, secondaires aux problèmes techniques présents dans cette stratégie :

- Gestion de l'anastomose cavo-pulmonaire, avec le risque de sténose, ou du stent débordant dans la lumière de l'AP.
- Présence d'endofuite entre la tunnellisation cavo-cave et l'atrium.
- Migration du stent couvert au niveau de l'ostium des veines sus-hépatiques.
- Résultats à long terme en suspens.

L'ensemble de ces problématiques techniques ne peuvent être résolues facilement, devant l'impossibilité de faire progresser la technique, autre que chez l'homme, difficilement acceptable sur le plan éthique eu égard aux résultats de la chirurgie conventionnelle. Néanmoins, l'approche hybride, visant à diminuer la morbi-mortalité de ces enfants est séduisante et prometteuse. L'absence de modèles animaux survivants, capables de simuler une circulation de Fontan, en vue de faire évoluer cette technique est donc primordiale. Nos travaux présentés ci-dessus n'ont pas permis de simuler une circulation de Fontan in vivo, toutefois notre modèle animal a permis de reproduire l'ensemble des contraintes anatomiques présentes lors d'une totalisation de Fontan par voie percutanée. La réalisation d'une dérivation cavo-atriale supérieure nous permet de mimer parfaitement la complexité de la connexion du chenal cavo-pulmonaire inférieur présent chez l'homme, lieu des conflits anastomotiques (artère pulmonaire-stent), de la discongruence (ente le future chenal et l'artère pulmonaire) et le tout, sous l'influence de la croissance.

Nos travaux nous ont conduit vers la conception d'un modèle extracardiaque circulant, s'adaptant à la croissance, s'affranchissant des conflits anastomotiques marqués par la discongruence de la jonction cavo-pulmonaire et de la perte énergétique potentielle qui pourrait en résulter.

Ce modèle animal in vivo en croissance, nous a donc permis de résoudre les problématiques actuelles rencontrées chez l'homme lors d'une procédure de Fontan par voie percutanée. Il restera à définir le type de protocole d'anticoagulation devant la survenue de microthrombi potentiel, en présence du tube en Gore-Tex<sup>®</sup> associé à une poche borgne. Avant cela, nous devons évaluer l'impact que représente la chirurgie de pré-conditionnement chez l'enfant.

En effet lors d'une telle procédure, la première intervention doit être réalisée au temps de la dérivation cavo-pulmonaire partielle. Ce temps opératoire est dénommé chirurgie de pré-conditionnement. Evidemment, il vient compliquer le geste d'une simple DCCP et n'est sûrement pas sans conséquence, même si les études cliniques actuelles ne rapportent pas un taux de morbi-mortalité élevé. Les auteurs de cette technique ne rapportent aucun décès et n'ont pas rapporté de complications à court ou moyen terme lors de la chirurgie de pré-conditionnement couplé à la DCCP [37, 40, 41, 92]. Notre modèle de dérivation extracardiaque ne nécessite pas de CEC, néanmoins il vient compliquer la dérivation cavo-pulmonaire partielle. Il imposera un clampage partiel de l'AP droite. Dans cette stratégie, il faudra réaliser d'une part, la chirurgie de pré conditionnement avant de s'affranchir d'une éventuelle anastomose systémico-pulmonaire ou voie antérograde. Il est évident que les résultats de ce temps opératoire seront impactés par une morbi-mortalité plus lourde que ceux que nous connaissons actuellement.

Par ailleurs, si, sur le plan théorique l'approche hybride dans la prise en charge des cœurs univentriculaires, se révèle de par sa nature moins invasive, le plus intéressant dans son développement, est surtout qu'elle nous permet de repenser la stratégie de totalisation de Fontan. La procédure de totalisation percutanée, peut être guidée par un monitoring pressionnel, nous permettant d'adapter au mieux les flux pulmonaire et systémique au profit du ventricule unique lors d'un passage d'une circulation en parallèle vers une circulation en série.

En effet, même si les progrès de ces dernières années ont permis de diminuer le risque de mortalité et de morbidité d'une totalisation de Fontan extracardiaque, cette chirurgie n'en demeure pas moins invasive et risquée. Il existe une mortalité précoce non négligeable rapportée entre 1 et 5%, suivant les séries, les techniques et les équipes chirurgicales [21, 152-154]. Les difficultés rencontrées durant la période postopératoire sont liées essentiellement à la circulation de Fontan elle-même, caractérisée par le fait de passer d'une circulation en parallèle vers une circulation en série. Il n'y a pas réellement de phase transitionnelle, autre que le temps de la DCP, nous sommes sur un mode « On – Off ». La durée de séjour en réanimation sera donc déterminée par l'obtention d'un équilibre hémodynamique entre la circulation pulmonaire et systémique jusqu'à ce que le débit cardiaque soit optimisé. Ainsi, en fonction des résistances pulmonaires, de la fonction du ventricule unique, de la volémie, surviendront des temps de réanimation plus ou moins longs, avec des conséquences liées à la sédation, l'analgésie et la ventilation mécanique. Des effusions pleurales, des troubles rythmiques, inhérents aux modifications de charge vasculaire, ventriculaire et métabolique, viennent alors compliquer la procédure chirurgicale, caractérisant la morbidité du processus de totalisation de Fontan [21, 152-154]. Une des clés, permettant l'équilibre physiologique d'une telle circulation réside dans l'équilibre des débits pulmonaire et systémique. La mécanique ventilatoire a un véritable impact sur le flux pulmonaire passif et il est donc capital de lever la sédation le plus rapidement possible, afin que le retour veineux ne soit pas impacté par une ventilation mécanique [155]. Dans le même esprit, afin d'assurer au plus vite un débit cardiaque dans des conditions de pression veineuse acceptable, outre de recruter les muscles respiratoires, il est possible de créer une fenestration, assurant un shunt droit / gauche garantissant une pré-charge ventriculaire au prix d'une diminution de la pression partielle systémique en oxygène.

Sur ces deux derniers points cruciaux, que sont l'intérêt de maintenir une mécanique respiratoire sans pression pulmonaire d'exsufflation positive et la nécessité ou pas d'une fenestration, l'approche hybride permet sans aucune mesure un bénéfice certain.

Les données actuelles de la littérature sur les résultats d'une telle procédure en termes de morbi-mortalité sont rares et doivent être interprétés avec prudence. Ce qui est mis en avant, dans la grande majorité des séries lors d'une totalisation de Fontan percutanée, est l'absence de conversion chirurgicale, l'absence de mortalité hospitalière et une gestion postopératoire simple. Les patients sont sevrés de leur respirateur dans les suites de la procédure, avec une surveillance en soins intensifs à minima [37, 40, 156]. Dans la série la

plus importante actuellement publiée par Alsoufi et al, il ne rapporte aucun décès précoce durant la procédure de totalisation et seulement 30 % des patients bénéficiaient d'une ventilation mécanique prolongée, associée à un support inotrope [157]. La durée de séjour médian en soins intensifs était de 1 jour et de 6 jours en hospitalisation. Un patient était décédé quelque mois après la procédure sans que la cause en soit connue.

Il est difficile, voire impossible à ce jour, de juger de la pertinence d'une approche hybride sur les résultats à court ou à long terme. Nous pouvons juste concevoir aisément, que l'adaptation hémodynamique vers une circulation de Fontan est moins déstabilisante que lors d'une chirurgie conventionnelle. Cette procédure permet de s'affranchir des risques hémorragiques, des problèmes d'hémodilution, de la douleur, des effets d'une sédation profonde, d'une intubation mécanique prolongée. Par ailleurs, nous avons la possibilité d'adapter au mieux la précharge du ventricule unique eu égard au gradient de pression transpulmonaire que nous pouvons mesurer en temps réel, au cours de la procédure de totalisation. Lors de la chirurgie conventionnelle, nous n'avons aucun moyen de calibrer cette fenestration d'une part et d'autre part d'en juger la réelle pertinence. La fenestration comprend divers avantages durant la période postopératoire, tels que : le maintien du débit cardiaque, la prévention de l'élévation de la pression veineuse centrale, la réduction des effusions pleurales, et une diminution de la prise en charge en soins intensifs [158, 159]. Cependant, il est toujours difficile hormis en présence d'une totalisation de Fontan chez des patients à haut risque (résistances pulmonaires élevées, ventricule unique défaillant, fuite de la valve atrio-ventriculaire) de garantir le réel intérêt d'un tel shunt. A terme, la fenestration peut devenir un handicap, source d'une désaturation chronique et/ou d'embolies paradoxales. Ainsi, la fermeture par un stent couvert est généralement de mise [160] sans toutefois, que les bénéfices en soit encore certains [161, 162]. L'avantage de réaliser une totalisation de Fontan par voie percutanée est la possibilité de s'adapter au régime de pression quel que soit le patient, en modulant progressivement dans le temps le volume de précharge du ventricule unique. La phase de totalisation devient « adaptative » à la fonction systolo-diastolique du ventricule unique et au gradient de pression transpulmonaire, elle peut être faite « sur mesure ». Ainsi, nous pouvons facilement imaginer que la prise en charge de ces patients porteurs d'un cœur univentriculaire peut être considérée comme plus sûre et simplifiée. Cette possibilité peut nous faire revoir totalement la stratégie de totalisation des cœurs univentriculaires, en fonction de la présence ou non d'une voie antérograde, du type de

ventricule unique, de la présence d'une fuite AV, ou d'un gradient transpulmonaire défavorable.

On comprend dès lors, lorsque cette technique sera validée, que la stratégie de totalisation ne sera peut-être plus la même. Les questions quand Totaliser ? Devenons-nous Fenestrer ? ne seront plus dépendantes de la technique chirurgicale, de ses risques et de la croissance, mais fonction du niveau de la  $VO_{2max}$  du patient et des capacités de son ventricule unique. En nous affranchissant des problèmes de croissance et de la taille du tube, nous avons la possibilité de faire des procédures itératives adaptées au régime de pression.

Enfin, si nous voulons aller encore plus loin, cette procédure permet dans le même temps de réaliser aisément une valvulation du chenal cavo-cave. Même si Malekzadeh-Milani et al. n'ont pas observé de réels bénéfices cliniques chez l'homme et que la valvulation devrait probablement être limitée aux patients atteints de reflux du système veineux abdominal [163], nous savons que la mise en place d'une valve augmente le débit antérograde de la circulation systémique en améliorant la capacité à l'effort, et diminue également les signes d'entéropathie exsudative [164, 165]. La possibilité de valver très précocement le chenal cavo-pulmonaire pourrait, peut-être, diminuer les complications à long terme d'une circulation de Fontan.

Dans tous les cas, nous pensons que si nous pouvions valider un pré-conditionnement extracardiaque chirurgical chez l'homme, tel que nous l'avons imaginé, une totalisation de Fontan percutanée, nous aiderait à adapter les flux pulmonaire et systémique en vue d'établir une circulation de Fontan dans des conditions optimales en s'affranchissant des complications actuellement décrites lors d'une totalisation par voie percutanée.

Ainsi, l'approche hybride dans la conception d'une circulation de Fontan, devrait à terme permettre de diminuer la morbi-mortalité inhérente à la procédure de DCPT chirurgicale de par son approche moins invasive et surtout, par les possibilités offertes d'une adaptation du passage d'une circulation en parallèle vers une circulation en série. In fine, si nous sommes capables d'adapter la précharge ventriculaire nécessaire et suffisante pour assurer un débit cardiaque optimal, nous préserverons au mieux notre ventricule unique et diminuerons les complications à long-terme d'une circulation de Fontan ; le pronostic de nos patients devrait s'en voir amélioré.

## 4.2 Optimisation du métabolisme énergétique myocardique

Pour être simple et finaliste, l'usine énergétique myocardique peut être assimilée à la mitochondrie [166]. Dans notre approche énergétique visant à optimiser l'énergétique cardiaque il est donc naturel que nous ayons cherché à réaliser des études observationnelles de la fonction mitochondriale et de la production de ROS qui en découle dans un cœur sain, soumis à un stress et lorsque ce dernier est en décharge.

L'objectif était de quantifier la capacité de production énergétique de la mitochondrie au sein du myocarde en fonction de la variation de la charge de travail, afin d'étayer des hypothèses mécanistiques sur les capacités d'adaptation de la chaîne respiratoire mitochondriale, sur lesquelles nous pourrions influencer.

Partant du constat qu'il existe une variabilité intrinsèque entre les couches musculaires sous endocardique myocardique et épocardique, liée essentiellement à leurs dispositions anatomiques et aux contraintes mécaniques [97, 98, 133-137, 167, 168], il était pertinent de dissocier l'activité énergétique entre ces deux strates musculaires mesurée par l'activité mitochondriale.

Le cœur sain représentant la charge hémodynamique de travail de base, l'analyse de la fonction mitochondriale entre ses couches musculaires, couplé à la quantification de la production de ROS, de NO et de l'activité du PTPm nous permettra d'élaborer les hypothèses de régulation de la production énergétique de la chaîne respiratoire en fonction de contraintes mécaniques différentes.

En augmentant les contraintes mécaniques d'un cœur, en réalisant un modèle de surcharge en pression, cela nous permettra d'évaluer la capacité d'adaptabilité de la production énergétique des mitochondries. A contrario, l'étude de la capacité de production énergétique mitochondriale, mais cette fois ci, sans contrainte hémodynamique devrait infirmer si effectivement l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale dépend réellement des conditions de charge hémodynamique.



#### 4.2.1 Différences transmursales des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale dans un cœur sain

Un ensemble de preuves considérable a été accumulé quant à l'hétérogénéité myocardique du cœur sain, incluant un flux sanguin, une structure, un métabolisme, des propriétés électrophysiologique et contractile différentes, et supportant généralement une augmentation du stress mécanique et de la contractilité dans l'Endo. Nos résultats contre toute attente ont retrouvé une diminution de la capacité oxydative des couches musculaires sous-endocardiques soumises pourtant à des contraintes supérieures. Peu de données existent concernant l'existence d'un gradient énergétique à travers la paroi du VG. De précédentes études, utilisant des mitochondries isolées, ont montré soit une capacité oxydative similaire dans l'Endo et l'Epi [137], soit une capacité augmentée dans l'Endo [169]. Ces études sur la respiration mitochondriale, en utilisant des mitochondries isolées, semblent moins intéressantes que l'utilisation ou l'observation de fibres musculaires saponifiées à cause d'une part de la non-homogénéité et de la fragilité des mitochondries soumises aux procédures d'isolation, et d'autre part à l'absence de son environnement global architectural mitochondrial [170] [171]. MacDonald et al. [111] ont récemment investigué les différences transmursales de la capacité respiratoire du VG, et aucune différence n'a été observée chez des rats sains. Ces données sont en opposition avec nos résultats, alors que des animaux et techniques similaires ont été utilisés dans les deux études.

Dans notre étude nous avons clairement observé que la capacité oxydative sous-endocardique était significativement plus faible que la capacité sous-épicardique. Ces différences se vérifient pour les complexes I, III, et IV de la chaîne respiratoire mitochondriale. Parallèlement à ces résultats nous avons retrouvé une augmentation significative de la production d' $H_2O_2$  ou d'anion superoxyde dans les couches sous endocardique, une augmentation de la production de NO, le maintien de l'ouverture du PTPm entre les différentes couches musculaires, et enfin une capacité d'ouverture du PTPm provoquée par une charge calcique, similaire. Au vu de ces résultats, il est plausible que l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale soit diminuée dans les couches sous-endocardiques.

Le gradient de NO observé pourrait être responsable de la diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire dans l'Endo par rapport à l'Epi diminuant la vitesse maximale respiratoire mitochondriale, par une inhibition directe réversible de la cytochrome c

oxydase et par la production d'espèces radicalaires nitrées (RNS), menant à une S-nitrosylation des complexes respiratoires [102, 114, 172].

Il est également connu que l'augmentation de radicaux libres, est une source de dysfonction mitochondriale [101, 126]. Néanmoins, la dysfonction mitochondriale elle-même, est également une source de production de ROS, et la diminution de la respiration mitochondriale pourrait être à l'origine de la surproduction de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et de l'augmentation de la production d'anion superoxyde.

Ainsi, le fait qu'il existe un véritable gradient transmural énergétique entre les différentes couches musculaires ne serait pas surprenant. Il nous est cependant impossible d'affirmer que la surproduction de NO en soit directement responsable et que l'augmentation de la production de ROS des couches sous- endocardiques en soit la conséquence. Seule la stabilité de l'ouverture du PTPm tend à démontrer que la surproduction de ROS ne favorise pas l'apoptose PTPm dépendante. Par ailleurs, l'augmentation de la concentration de NO pourrait être responsable de l'inhibition de l'ouverture du PTPm [45, 116]. Actuellement, il devient de plus en plus clair que le NO agirait comme un véritable régulateur de la balance Nitroso-Redox, transducteur du signal des phénomènes physiques externe régulant l'expression génique approprié au stimuli [117].

Il existerait un paradoxe biologique, avec la nécessité d'une surproduction de NO dans les couches sous- endocardiques pour assurer le maintien du flux sanguin (sous-entendu la pression partielle tissulaire en oxygène), et de la contractilité (réponse sarcomérique), au prix d'une diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales, entraînant une surproduction d'espèce radicalaire ; le NO lui-même protégeant la mitochondrie devant l'augmentation des radicaux libres en inhibant l'ouverture du PTPm.

Davantage d'études seront nécessaires afin de démontrer si un défaut d'expression transmural des NOS, en l'occurrence la NOS1 (neuronale) et NOS3 (endothéliale) présentes dans les cardiomyocytes, peuvent déstabiliser l'équilibre énergétique myocardique et être responsable d'une dette énergétique. Ainsi, une des pistes à explorer pour l'optimisation de l'énergétique cardiaque serait de diminuer l'affinité du NO pour le cytochrome C oxydase au profit de l'O<sub>2</sub>.

#### 4.2.2 Surcharge en pression – adaptation énergétique et production de ROS

Dans notre étude, nous avons observé un fait surprenant, mais finalement cohérent avec ce qu'il se passe dans les couches sous- endocardiques d'un cœur sain. L'augmentation du travail myocardique lié à une surcharge en pression se caractérise par une diminution des activités des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ce phénomène est associé à une augmentation de la production de peroxyde d'hydrogène, corroborant l'hypothèse que face à un stress myocardique, ou à une augmentation de la production de travail, l'adaptation énergétique ne se fait pas par une augmentation de la phosphorylation oxydative ; pire encore, ses capacités s'en voient réduites. Ainsi, pour assurer les besoins énergétiques du myocarde face à une augmentation de travail, le cœur ne peut que compenser en augmentant ses unités de production via l'activation de la biogénèse mitochondriale comme en atteste l'augmentation de l'activité de la citrate synthase dans notre étude. A contrario, il est rapporté une diminution de la biogénèse mitochondriale en présence d'HVG mais principalement en présence d'une dysfonction myocardique [147]. En somme, ces résultats suggèrent que la mitohormèse module l'activité énergétique cellulaire myocardique face au stress. En d'autres termes, l'augmentation des espèces radicalaires dans des proportions « raisonnables » en activant la biogénèse mitochondriale [79, 80], permettrait l'augmentation de la production énergétique face à la demande. Le passage vers l'insuffisance cardiaque se ferait lorsque le processus de biogénèse mitochondrial ne serait plus en mesure de contre- balancer la diminution des capacités respiratoires de la chaîne mitochondriale.

Sur des mitochondries isolées, prélevées le plus souvent sur le septum musculaire, après une surcharge en pression, il était rapporté une augmentation de la capacité oxydative mitochondriale maximale durant les 6 premières semaines, puis normale après 10 semaines, et enfin significativement réduite après 20 semaines dans un modèle de surcharge en pression [173]. Par conséquent, il est généralement accepté que la fonction mitochondriale est altérée lorsque que surviennent cliniquement les signes de l'insuffisance cardiaque. Nous assistons à une incapacité du myocarde à assurer une production énergétique face au besoin [125, 131, 166, 173]. Il semblerait, au vu de nos résultats sur des fibres musculaires saponifiées, prélevées de façon pertinente (Endo – Epi), (non prélevées du septum musculaire), dans un cœur soumis à une augmentation de travail durant 6 semaines, avec une augmentation de la masse de 31,7% attestant d'une HVG, et sans aucun signe clinique d'insuffisance cardiaque, qu'il existe en fait, dès ce stade, une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nos résultats vont dans le sens d'études également observationnelles où l'on constate dès la phase

précoce d'un diabète induit par la streptozotocine, une altération de la respiration mitochondriale, via une diminution de l'activité des complexes I et IV [111].

Actuellement, il semble admis, même si un découplage mitochondrial ne doit pas toujours être considéré comme délétère [141, 174], que l'augmentation de travail liée à la post-charge est associée à un découplage mitochondrial lorsque que nous sommes au stade de l'insuffisance cardiaque. Ainsi, Faerber et al. [175] ont observé non seulement des vitesses respiratoires diminuées, mais aussi un couplage mitochondrial émoussé, dans des cœurs de souris soumis à une augmentation de post-charge en présence d'une insuffisance cardiaque, certes, mais aussi dès le stade précoce de l'HVG sans la présence d'une dysfonction myocardique. Ces résultats sont en adéquation avec les nôtres, même si à notre stade nous n'avons pas mis en évidence de découplage mitochondrial, nous enregistrons une véritable diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales. Cela peut être expliqué par le faible degré d'HVG d'une part et la courte durée d'exposition au stress d'autre part dans notre étude.

Comme nous l'avons rapporté à l'instant, parallèlement à cette diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales, dès la phase précoce de l'HVG, nous observons une augmentation de radicaux libres mesurés indirectement par la concentration d' $H_2O_2$  produite. Cette production de radicaux libres est donc directement imputable à cette dysfonction mitochondriale. Or, ce qui est admis actuellement, c'est que l'excès de production de ROS lors d'une augmentation de la post-charge participerait à la transduction du signal assurant le remodelage myocardique vers l'hypertrophie ventriculaire gauche [123]. Une des interrogations restées en exergue était de connaître la source initiale de production de ces ROS et de déterminer si la mitochondrie en est la cause ou la conséquence [123, 124, 176]. Les sources de production des espèces radicalaires connues en présence d'une SP sont l'oxyde nitrique synthase découplée, la xanthine oxydoréductase, et le NADPH oxydase [123]. Or, nous savons que les mitochondries sont les plus grandes productrices de ROS, surtout en présence d'une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale [177]. Nos données confirment donc que la mitochondrie participe activement à la production de ROS en présence d'une surcharge en pression et que probablement elle en est une des causes princeps [143, 146]. Cela conforterait l'hypothèse que l'HVG est bien un phénomène mal adaptatif du départ. La chaîne respiratoire mitochondriale est incapable d'augmenter la phosphorylation oxydative, il existerait une perte de l'équilibre Nitroso-redox induisant une production de

radicaux libres, qui orienterait le myocarde vers un remodelage tissulaire activant en parallèle la biogénèse mitochondriale.

#### 4.2.3 Influence du gradient transmural myocardique mécanique dans la régulation du métabolisme énergétique.

Si nous nous intéressons maintenant au gradient transmural entre les couches Endo et Epi du myocarde dans le cœur sain, en présence d'une surcharge en pression et dans un cœur sans contrainte hémodynamique, il est intéressant de constater que ce gradient transmural est préservé en présence de contrainte pariétale et disparaît dans un cœur sans travail à fournir ou stress pariétal.

Nos résultats nous permettent de considérer qu'il existe une altération des capacités oxydatives mitochondriales, associée à une surproduction d' $H_2O_2$  que ce soit au niveau des couches musculaires les plus exposées aux contraintes dans un cœur sain, ou en présence d'une surcharge en pression, excepté pour le complexe IV au niveau de l'épicarde lors de l'HVG.

Ainsi, nous pouvons argumenter fortement que le stress pariétal généré au sein de la paroi myocardique, est à l'origine de ce gradient énergétique.

Si maintenant, nous analysons nos résultats comme un tout, faisant abstraction des biais méthodologiques (sachant qu'il s'agit de 3 études différentes où l'ensemble des paramètres n'ont pu être évalués), nous pouvons admettre que le stress pariétal myocardique agit négativement sur la phosphorylation oxydative, le corollaire étant une augmentation de la production d'espèces radicalaires. Il apparaît que l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales n'a aucune capacité de régulation énergétique positive pour adapter sa production de phosphorylation face à l'augmentation des contraintes myocardiques. Il semblerait, au vu de nos résultats sur le NO dans le cœur sain, que les mitochondries subissent une « pression environnementale » imputable à l'équilibre gazeux présent spatialement (Oxygène, Monoxyde d'Azote), produisant inéluctablement une fuite d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. L'affectation de la balance Nitroso-Redox qui en découlerait, pourrait induire le mitohormésis et l'hormesis, responsables du remodelage ventriculaire dans l'HVG par exemple [123, 124, 178]. Il est intéressant de constater que ce que nous considérons comme un mécanisme adaptatif (HVG) et physiologique dans un cœur sain (Gradient transmural), ne puisse au vu de nos résultats, être caractérisé de la sorte au

niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. La chaîne respiratoire mitochondriale n'a visiblement pas la possibilité moléculaire ou chimique de s'adapter à son environnement gazeux. Cette déduction rappelle notre relation symbiotique avec la mitochondrie, définie par la fusion de deux espèces qui potentialise leurs effets [179]. Devant l'imperfection de notre relation, nous avons développé des subterfuges, permettant tout de même d'adapter nos besoins énergétiques face à la demande en activant la biogénèse mitochondriale d'une part, et d'autre part par la mise en place de systèmes antioxydants.

En exploitant un peu plus nos résultats nous pouvons émettre des hypothèses mécanistiques pour comprendre ce qu'il se passe à l'échelle mitochondriale et gazeuse. Nous savons qu'il existe des mécanorécepteurs myocardiques induisant l'expression de NOS, permettant de traduire les contraintes pariétales en un signal gazeux, le NO. Comme nous le savons le NO est un gaz qui joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et mitochondriale [180]. Nos résultats sur le cœur sain de rat mettent en évidence un gradient transmural de NO, proportionnel aux contraintes myocardiques et inversement proportionnel à la fonction mitochondriale et à la production d' $H_2O_2$ , ce qui en fait un candidat idéal dans la perturbation de la chaîne respiratoire mitochondriale et de ce que nous observons.

Corroborant notre hypothèse, nous savons que la synthèse de eNOS (endothélium) ou NOS3, productrice de NO est régulée par des mécanorécepteurs présents au niveau des cellules endothéliales. La mécano-stimulation, répond au stress pariétal et régule l'expression de l'ARNm eNOS et donc l'expression phénotypique de cette protéine [181, 182]. La eNOS est présente principalement sur l'endothélium où il existe par ailleurs un gradient d'expression au profit des couches musculaires Endo [183]. Cette compartimentalisation des NOS au niveau tissulaire et cellulaire, associée à une capacité de régulation d'expression génique, donne au NO la possibilité de jouer le rôle de transducteur du signal pour que le tissu, la cellule puisse répondre aux facteurs environnementaux. Le NO est le médiateur fondamental, entre autres, dans la capacité d'adaptation cardiovasculaire aux contraintes physiques mécaniques. Par ailleurs, le NO agit directement sur le Cytochrome C Oxydase (complexe IV de la chaîne respiratoire) centre réducteur de l' $O_2$  permettant la production de 4 ions  $H^+$  garantissant la force proton motrice indispensable à la phosphorylation oxydative [184].

Comme nous l'avons déjà développé ci-dessus, le NO interagit avec une affinité supérieure à l'oxygène sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Le processus de respiration est caractérisé par la réduction d'une molécule d' $O_2$  en  $H_2O$ , à la suite d'une succession

d'étapes ordonnées qui apportent 4 électrons au niveau d'une métalloenzyme, qui catalyse cette réaction redox de l'O<sub>2</sub> et permettant également d'éjecter 4 protons dans l'espace intermembranaire. Cette métalloenzyme est le cytochrome C oxydase ou Complexe IV de la chaîne mitochondriale. C'est ce phénomène qui caractérise la respiration mitochondriale proprement dite, lieu également d'une forte production de ROS et de RNS [179, 184-189]. Afin que la molécule d'oxygène soit captée par le centre bi-métallique (Fer, Cuivre associés au Phénol) du cytochrome C oxydase, il est nécessaire d'une part qu'il soit insaturé, prêt à recevoir l'O<sub>2</sub>, et que les 4 électrons soit portés par les ions métalliques prêt à réduire l'oxygène. En présence de 4 électrons, on peut considérer que seulement 2% de ROS se produisent, alors qu'en présence de 2 électrons, il se produira une réduction partielle de l'O<sub>2</sub> conduisant à la formation de plus de 20% d'espèce radicalaire [190]. Donc pour qu'une réduction de l'oxygène se fasse dans des proportions stœchiométriques, il est nécessaire que 4 électrons soit présents au niveau du complexe IV, afin d'assurer une phosphorylation oxydative efficiente avec une production minimale d'espèce radicalaire. Dans l'environnement physiologique mitochondrial, plusieurs ligands gazeux sont susceptibles d'interagir avec le centre métallique du cytochrome C Oxydase, comme le NO, plus rarement l'H<sub>2</sub>S ou le sulfure d'hydrogène et le CO ou monoxyde de carbone. L'ensemble de ces gaz agissent avec une affinité supérieure à l'oxygène sur le centre métallique du cytochrome C oxydase. Le NO en présence physiologique, assure son inhibition. Il se produit alors une augmentation d'anion superoxyde, par défaut de réduction de l'O<sub>2</sub>, qui vient alors inhiber l'effet du NO en formant une espèce nitré radicalaire et libérer dans le même temps le site du complexe IV [190, 191]. Le couplage anion superoxyde/NO est reconnu comme une paire endogène qui assure la protection du cytochrome C oxydase des ligands exogènes et permet d'annihiler l'effet du NO lui-même.

On comprendra que suivant la répartition de la concentration d'oxygène ou du NO au niveau transmural du muscle cardiaque et des cardiomyocytes, nous aurons une variation du métabolisme énergétique. Une diminution de la concentration d'O<sub>2</sub> ou une augmentation de la concentration de NO se traduira par une diminution de la phosphorylation oxydative et une augmentation de la production de ROS, ou de RNS. Le degré de production de ces espèces radicalaires oxygénées ou nitrées, couplé à leur degré de répartition spatio-temporelle seront les catalyseurs autocrine ou paracrine du remodelage myocardique conduisant à terme aux grandes pathologies cardio-vasculaires [180].



Cette régulation, ou plutôt, pression environnementale gazeuse, pourrait expliquer la diminution de l'activité du Complexe IV isolé lors d'une HVG débutante. En effet nous savons que la consommation d'O<sub>2</sub> est augmentée au niveau de l'épicardique dans l'HVG [192]. Par ailleurs, en présence d'une hypoxie tissulaire nous avons une augmentation de la production de NO via l'hémoglobine réductase et la xanthine oxydoréductase. L'objectif étant d'assurer la vasodilatation permettant le maintien d'une perfusion vasculaire, le tout afin de lutter contre l'hypoxie [192, 193]. Ainsi, il se pourrait bien que le ratio O<sub>2</sub>/NO soit défavorable dans l'Epi en présence d'HVG au profit du NO. Nous assisterions alors à une diminution de l'activité du complexe IV dans l'épicarde. Il est très difficile d'émettre des hypothèses plausibles pour expliquer pourquoi seule l'activité du complexe IV serait diminuée en premier lieu en présence d'une surcharge en pression. Ce constat témoigne essentiellement de l'importance probable du cytochrome C oxydase associé à de la répartition spatiale du gradient gazeux dans les mécanismes régissant le remodelage myocardique. Nous pouvons mettre en parallèle à cette diminution d'activité du complexe IV dans les couches épiscopardiques en présence d'une HVG, les résultats de Jameel et al. [194] qui retrouvent une plus grande sensibilité au stress des couches musculaires sous Epi avec un changement de profil métabolique, en présence d'une pathologie ischémique préexistante.

En somme, nous pouvons étayer comme hypothèse mécanistique impliquant la mitochondrie dans le remodelage myocardique, la présence d'un rapport gazeux O<sub>2</sub>/NO inhérent à l'anatomie de l'organe et de sa vascularisation définissant, ce que nous pouvons appeler « la pression environnementale » mitochondriale. La chaîne respiratoire mitochondriale ne pourrait que subir l'influence de ces rapports gazeux reflétant les contraintes physiques, chimiques et toxiques présentes dans un environnement cellulaire qui lui est propre. Il se produirait en fonction de l'efficacité du couplage oxydatif mitochondrial, une plus ou moins grande concentration d'espèces radicalaires devant la modification de la balance Nitroso-Redox. Le complexe IV deviendrait alors le lieu de transformation d'un signal physique (extérieur) induit par le NO, en un signal chimique engendrant la production d'espèces radicalaires. La capacité du NO, des ROS et des RSN à activer les diverses voies de signalisation, assurerait ou non l'homéostasie cellulaire, tissulaire, garantissant ou pas les capacités fonctionnelles de l'organe à produire l'énergie nécessaire et suffisante pour s'adapter au stress.

D'un point de vue physiologique, garantir l'équilibre gazeux O<sub>2</sub>/NO tissulaire quel que soit le stress, serait le seul moyen d'assurer une fonction mitochondriale efficace avec une

production d'espèces radicalaires minimale, assurant le mitohormésis ou l'hormésis.

Nos travaux sur le métabolisme énergétique nous montre que la chaîne respiratoire mitochondriale n'a pas la capacité à s'adapter devant un stress, elle subit ; affectant négativement la phosphorylation oxydative et la balance Nitroso-Redox conduisant à la formation d'espèces radicalaires ; l'ensemble étant suppléé temporairement par l'activation de la biogénèse mitochondriale, la production d'antioxydant, et l'activation des grandes voies signalisations assurant un remodelage ventriculaire, adaptatif ou mal-adaptatif ?

### 4.3 Optimisation de la prise en charge d'un cœur uni ventriculaire

De l'ensemble de nos travaux nous pouvons affirmer que :

La régulation du métabolisme énergétique myocardique semble nous imposer une totalisation de Fontan le plus précocement possible afin de limiter la surcharge de travail des cardiomyocytes qui n'ont pas la capacité énergétique à s'adapter autre qu'en activant la biogénèse mitochondriale.

Nous savons par ailleurs que la prévalence de la dysfonction ventriculaire systolique et diastolique continue d'augmenter lors de la vie adulte conduisant inéluctablement vers la dysfonction d'une circulation de Fontan. L'hypoxémie chronique couplée à la surcharge volumique ventriculaire précoce dans la vie de l'enfant pourrait du départ conditionner un remodelage ventriculaire « mal-adaptatif » [28, 29].

Il est probable qu'il existe un équilibre positif de la balance Nitroso-redox induisant un mitohormésis et un remodelage « adaptatif » ou plutôt compensé, permettant au myocarde de faire face à une augmentation de travail au long cours. Cette théorie nous permettrait d'envisager qu'une circulation mixte bien calibrée serait une alternative bénéfique, sous réserve d'une extraction périphérique en oxygène adaptée.

L'approche d'une totalisation de Fontan par voie percutanée avec un pré-conditionnement chirurgicale précoce, pourrait répondre à cette exigence. La totalisation partielle pouvant avoir lieu plus précocement dans la vie de l'enfant. Il resterait à déterminer la taille du shunt idéale conditionnant un remodelage ventriculaire compensé.

Au final, nous nous approcherions d'une circulation et d'un cœur reptilien à trois cavités avec un ventricule. Cette analogie phylogénique nous rappelle qu'au fil de l'évolution les mammifères ont évolué vers un cœur à quatre cavités. Le rendement énergétique du cœur non compacté des reptiles, fonctionnant sur une circulation mixte, présentait des capacités oxydatives mitochondriales plus faibles que chez les mammifères (travaux non présentés dans ce travail). Ainsi, la seule façon de maintenir un débit cardiaque optimal avec une possibilité d'adaptabilité à l'effort, est de nous orienter vers une potentialisation de l'énergétique cardiaque.

La cible thérapeutique que nous avons identifiée au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale est la régulation de la balance Nitroso-redox et son influence sur le complexe IV. Cette balance Nitroso-redox semble avant tout dépendre des concentrations partielles en NO et O<sub>2</sub>. Si la pression partielle en oxygène est censée rester stable dans les tissus, hors phénomène pathologique, nous pouvons considérer que seule la concentration en NO, sous l'impulsion des stimuli extérieurs, influence le couplage de l'Oxygène sur le complexe IV et induit inexorablement la production d'espèces radicalaires.

Depuis quelques années, l'irradiation lumineuse des tissus biologiques dans le proche infrarouge (NIR), dit fenêtre optique thérapeutique (650-950nm) connue principalement sous les noms de « low light level therapy » (LLLT) ou « photobiomodulation » (PBM) ont montré des résultats prometteurs en médecine régénératrice. Il a été montré *in vitro*, que la PBM augmente les capacités oxydatives mitochondriales et la synthèse de l'ATP, induisant entre autres une prolifération cellulaire. Même si ce phénomène a du mal à être observé *in-vitro*, de nombreuses études *in-vivo* (en phase préclinique et clinique) ont confirmé des bénéfices incontestables de l'effet de la PBM [195, 196]. Il est intéressant de constater que l'irradiation lumineuse des tissus biologiques dans le proche infrarouge (NIR), module le transfert de charges électrochimiques à l'étage moléculaire. Il influence ainsi les processus biologiques et ce processus se passerait principalement au sein de la mitochondrie [197]. A ce jour, les mécanismes électrochimiques conditionnant l'action de la PBM ne sont pas compris, néanmoins le Cytochrome C oxydase, complexe IV, contient quatre atomes métalliques, dont les spectres d'actions sont dans la fenêtre du proche infra-rouge [198].

Si nos hypothèses mécanistiques, impliquant la mitochondrie et son environnement gazeux, comme étant à l'origine du remodelage myocardique, répondent aux pressions environnementales (Ischémique, Postcharge, Précharge, Toxique, Métabolique),

probablement le cytochrome C oxydase est une des molécules fondamentales dans la transformation d'un signal physique, en un signal chimique, déstabilisant le métabolisme énergétique. Au vu des effets précliniques et cliniques de la PBM, suivant le spectre d'action du Cytochrome c Oxydase, il est probable qu'une des solutions thérapeutiques de demain, pour optimiser le rendement énergétique cellulaire, se fasse par une irradiation lumineuse dans le proche infra-rouge.

## 4.4 Perspectives

### 4.4.1 Elaboration d'un projet de recherche clinique pour la totalisation de Fontan par voie percutanée

Au stade actuel de nos travaux de recherche préclinique, nous pouvons admettre que la totalisation de Fontan par voie percutanée est sûre, fiable et reproductible. Il resterait à évaluer dans le cadre d'un projet de recherche clinique, d'une part la faisabilité d'une chirurgie de pré-conditionnement tel que nous l'avons modélisé chez l'agneau en croissance, et d'autre part de réaliser un protocole de totalisation de Fontan percutané, définissant la procédure clinique de confection d'une circulation en série, complète ou partielle.

### 4.4.2 Evaluation et Rôle du NO, NOS, PTPm sur un myocarde en dette énergétique

Afin de conforter nos hypothèses mécanistiques, issues de notre travail observationnel entre les couches musculaires endocardique et épicaudique, nous allons mesurer les concentrations de NO, O<sub>2</sub>, l'expression des NOS et mesurer l'activité du PTPm dans un cœur sain et soumis à une surcharge en pression. Cela devrait nous permettre de renforcer nos suppositions sur le rôle déterminant du NO dans la diminution de l'activité des chaînes respiratoires mitochondriales transmuraux, et l'augmentation de la production d'espèce radicalaire, en présence d'une surcharge en pression. La mesure des concentrations d'O<sub>2</sub> sera également essentielle, afin de déterminer l'impact du NO en fonction de la pression partielle en O<sub>2</sub>.

Ainsi, outre nos hypothèses issues de nos observations sur le gradient énergétique transmurale adaptatif aux conditions de charges, nous serions, alors, en capacité de caractériser

le rendement énergétique des chaînes respiratoires mitochondriales en fonction de l'environnement gazeux myocardique. Ce rapport gazeux représenterait les conditions environnementales qui modulent l'activité du métabolisme oxydatif mitochondrial. Ces concentrations gazeuses pourraient être fortement incriminées comme les seules responsables de la voie d'activation de transduction du signal dans le processus de remodelage myocardique face à un stress. Le cytochrome C oxydase deviendrait, sans aucune mesure, la cible à privilégier dans la régulation du signal Nitroso-Redox et des capacités de production énergétique mitochondriale.

#### 4.4.3 Approche énergétique myocardique : PBM

##### 4.4.3.1 Déterminer les paramètres optiques de la PBM influençant la respiration mitochondriale.

Notre première approche sera de déterminer d'une part, si la PBM a une action sur la respiration mitochondriale myocardique, et d'autre part de caractériser les paramètres optiques optimaux dans un environnement gazeux physiologique et pathologique. Sur des modèles in-vitro, il sera alors possible d'élaborer des protocoles de PBM dans le but de maintenir un couplage mitochondrial optimal, quelles que soient les concentrations gazeuses, simulant des états pathologiques, sur des échantillons de cœur sain. L'objectif sera de définir les énergies vibrationnelles nécessaires au maintien d'une réduction complète de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O sur le Cytochrome c Oxydase, garantissant un métabolisme énergétique efficient.

##### 4.4.3.2 Evaluer in-vivo l'effet de la PBM dans la stabilisation de la balance Nitroso-Redox et son influence sur le remodelage tissulaire.

L'objectif sera donc de reproduire in-vivo le maintien d'une respiration mitochondriale efficiente en fonction des variations environnementales, surcharge en volume, en pression et à l'hypoxie. Les paramètres optiques seront fonction du choix de la source de délivrance, des conditions anatomiques, tissulaires et pathologiques. Si nos travaux aboutissent nous devrions pouvoir garantir un fonctionnement myocardique optimal quelles que soient les contraintes environnementales et éviter tout remodelage myocardique « mal adaptatif ».

#### 4.4.4 Approche énergétique extra-myocardique : La conception d'un tube pulsatile

##### 4.4.4.1 Pré conditionnement du muscle grand dorsal, Electrophysiologie, PBM, Thérapie cellulaire.

A ce stade nous avons mis ces travaux en suspens, car nous pensons que le pré-conditionnement du muscle grand dorsal bénéficiera d'une part de nos travaux issus de la PBM et d'autre part de nos travaux issus de protocole d'ingénierie tissulaire, développé ci-dessous.

##### 4.4.4.2 Modélisation d'un tube biologique, biocompatible aux effets lusitropes optimaux.

Nos travaux actuels portent sur la conception d'un tube biocompatible, aux propriétés lusitropes optimales, qui permettrait une adhérence du muscle grand dorsal sur son support. Il s'agirait d'un tube aux capacités de croissance, qui, réalisé prématurément dans la vie de l'enfant, pourrait s'adapter au contenu, à sa fonction. C'est en ce sens que nous développons des matrices extracellulaires issues de protocoles particuliers de décellularisation-désantigénisation de tissus et d'organes afin d'obtenir un équilibre entre biocompatibilité et intégrité mécanique du tissu [199]. Nous envisagerons ensuite la recellularisation de ce dernier par des cellules autologues (souches et/ou différenciées) au moyen de différentes techniques d'ingénierie tissulaire (bioréacteurs) afin de proposer un greffon parfaitement compatible et vivant, prêt à recevoir le muscle grand dorsal pré-conditionné, subissant l'influence de l'effet autocrine et paracrine des cellules autologues [200]. Parallèlement, nous développerons et testerons in vitro des greffons à partir de tissus (matrice et cellules) humains. De façon plus concrète, nous envisageons de réaliser un tube pulsatile capable de suppléer ou compléter la fonction cardiaque [201]. Il s'agirait d'une approche alternative, à la greffe cardiaque, l'assistance circulatoire ou encore la cardiomyoplastie de « Carpentier ».

## Conclusion

A ce jour, les enfants présentant une cardiopathie congénitale avec un seul ventricule conservent un pronostic péjoratif. En France, ou dans les pays ayant accès au diagnostic prénatal, il est proposé aux parents une interruption médicale de grossesse. Même si Fontan et Baudet [11] ont transformé le devenir de ces patients, en proposant une chirurgie palliative permettant de rétablir une circulation, dite passive, en série, un ventricule unique associé à ce mode de circulation n'est pas viable au long cours.

A travers nos travaux, nous avons eu une approche globale à la fois dans la conceptualisation d'une circulation dite de Fontan par voie percutanée, et sur les capacités d'adaptation énergétique d'un ventricule face à une augmentation de travail.

Notre travail clinique analysant le devenir d'une circulation mixte, nous a permis de conclure que la procédure de totalisation de Fontan est à ce jour, la seule palliation qui garantisse la meilleure chance de survie à long terme d'un enfant en présence d'un cœur univentriculaire. Afin de diminuer la morbidité d'une telle procédure, nous avons développé un modèle préclinique garantissant de manière sûre, viable et reproductible une chirurgie de pré-conditionnement, pouvant être réalisée au stade de la DCPP et permettant une totalisation par voie percutanée à distance. Cette nouvelle approche permettrait par ailleurs, d'adapter à la demande le débit pulmonaire et la charge de travail du ventricule unique.

Ce dernier point nous paraît fondamental dans la gestion des circulations pulmonaire et systémique, mais également dans l'orientation du remodelage ventriculaire.

En effet, notre approche énergétique myocardique nous incite à proposer que les cardiomyocytes n'ont pas les capacités oxydatives pour faire face à une augmentation constante de travail. L'augmentation des espèces radicalaires qui en résultera, induira un remodelage ventriculaire qui, inexorablement conduira à la dysfonction myocardique. Ce constat prônant pour une diminution des contraintes mécaniques myocardiques le plus tôt possible dans la vie de l'enfant.

L'ensemble résulterait d'un déséquilibre de la balance Nitroso-Redox, déstabilisant les propriétés oxydatives mitochondriales et induisant un remodelage ventriculaire. Il est impossible à ce jour de savoir si nous pouvons considérer le remodelage ventriculaire comme un temps adaptatif ou bien purement réactionnel et mal adaptatif, du départ. Ce que nous pouvons affirmer c'est que les contraintes doivent être limitées et modérées dans le temps, laissant peut-être la possibilité d'orienter le remodelage ventriculaire vers une situation d'équilibre, ouvrant la voie d'une circulation mixte adaptée aux propriétés mécaniques du ventricule.

Ainsi nos travaux, permettrons peut-être une approche différente dans la procédure de totalisation de Fontan, adaptative et conditionnant le remodelage ventriculaire. Mais, ils ouvrent également des nouvelles perspectives thérapeutiques :

- Visant à stabiliser, ou orienter la balance Nitroso-Redox en vue d'augmenter les propriétés oxydatives du muscle cardiaque.
- Dans la conception d'un tube pulsatile extracardiaque suppléant ou déchargeant les contraintes d'un ventricule unique.



# Bibliographie

1. Anderson, R.H., et al., *Problems in the nomenclature of the univentricular heart*. Herz, 1979. **4**(2): p. 97-106.
2. Corno, A., et al., *Univentricular heart: can we alter the natural history?* Ann Thorac Surg, 1982. **34**(6): p. 716-27.
3. Anderson, R.H. and S.Y. Ho, *Pathologic substrates for 1 1/2 ventricular repair*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(2): p. 673-7.
4. Anderson, R.H. and S.Y. Ho, *Which hearts are unsuitable for biventricular correction?* The Annals of thoracic surgery, 1998. **66**(2): p. 621-626.
5. Freedom, R.M. and G.S. Van Arsdell, *Biventricular hearts not amenable to biventricular repair*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(2): p. 641-3.
6. Di Filippo, S., *Ventricule unique*. Cardiologie, 2010.
7. Walker, S.G. and E.A. Stuth, *Single-ventricle physiology: perioperative implications*. Semin Pediatr Surg, 2004. **13**(3): p. 188-202.
8. Mondesert, B., et al., *Fontan circulation: success or failure?* Can J Cardiol, 2013. **29**(7): p. 811-20.
9. Sakaki, M., et al., *Influences of nonpulsatile pulmonary flow on pulmonary function. Evaluation in a chronic animal model*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1994. **108**(3): p. 495-502.
10. Gewillig, M., *Ventricular dysfunction of the functionally univentricular heart: management and outcomes*. Cardiol Young, 2005. **15 Suppl 3**: p. 31-4.
11. Fontan, F. and E. Baudet, *Surgical repair of tricuspid atresia*. Thorax, 1971. **26**(3): p. 240-8.
12. Choussat, A., *Selection criteria for Fontan's procedure*, in *Paediatric cardiology*. 1977. p. 559-566.
13. Azakie, A., et al., *Extracardiac conduit versus lateral tunnel cavopulmonary connections at a single institution: impact on outcomes*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **122**(6): p. 1219-28.
14. Stamm, C., et al., *Long-term results of the lateral tunnel Fontan operation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **121**(1): p. 28-41.
15. Alexi-Meskishvili, V., et al., *Mid-term follow-up after extracardiac Fontan operation*. Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **52**(4): p. 218-24.
16. de Leval, M.R., et al., *Total cavopulmonary connection: a logical alternative to atriopulmonary connection for complex Fontan operations. Experimental studies and early clinical experience*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1988. **96**(5): p. 682-95.
17. Marcelletti, C., et al., *Inferior vena cava-pulmonary artery extracardiac conduit. A new form of right heart bypass*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1990. **100**(2): p. 228-32.
18. Yetman, A.T., et al., *The extracardiac Fontan procedure without cardiopulmonary bypass: technique and intermediate-term results*. Ann Thorac Surg, 2002. **74**(4): p. S1416-21.
19. Fontan, F., et al., *Outcome after a "perfect" Fontan operation*. Circulation, 1990. **81**(5): p. 1520-36.

20. Khairy, P., et al., *Long-term survival, modes of death, and predictors of mortality in patients with Fontan surgery*. *Circulation*, 2008. **117**(1): p. 85-92.
21. Backer, C.L., et al., *Extracardiac versus intra-atrial lateral tunnel fontan: extracardiac is better*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2011. **14**(1): p. 4-10.
22. Marcelletti, C.F., et al., *Revision of previous Fontan connections to total extracardiac cavopulmonary anastomosis: A multicenter experience*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **119**(2): p. 340-6.
23. Mavroudis, C., et al., *Fontan conversion to cavopulmonary connection and arrhythmia circuit cryoblation*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998. **115**(3): p. 547-56.
24. van Son, J.A., et al., *Conversion of atriopulmonary or lateral atrial tunnel cavopulmonary anastomosis to extracardiac conduit Fontan modification*. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1999. **15**(2): p. 150-7; discussion 157-8.
25. Jacobs, M.L. and W.I. Norwood, Jr., *Fontan operation: influence of modifications on morbidity and mortality*. *Ann Thorac Surg*, 1994. **58**(4): p. 945-51; discussion 951-2.
26. Mitchell, M.E., et al., *Intermediate outcomes after the Fontan procedure in the current era*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. **131**(1): p. 172-80.
27. Anderson, P.A., et al., *Contemporary outcomes after the Fontan procedure: a Pediatric Heart Network multicenter study*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. **52**(2): p. 85-98.
28. Eicken, A., et al., *Hearts late after fontan operation have normal mass, normal volume, and reduced systolic function: a magnetic resonance imaging study*. *J Am Coll Cardiol*, 2003. **42**(6): p. 1061-5.
29. Piran, S., et al., *Heart failure and ventricular dysfunction in patients with single or systemic right ventricles*. *Circulation*, 2002. **105**(10): p. 1189-94.
30. Costello, J.M., et al., *Treatment of plastic bronchitis in a Fontan patient with tissue plasminogen activator: a case report and review of the literature*. *Pediatrics*, 2002. **109**(4): p. e67.
31. Kim, S.J., et al., *Outcome of 200 patients after an extracardiac Fontan procedure*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008. **136**(1): p. 108-16.
32. Idorn, L., et al., *Quality of life and cognitive function in Fontan patients, a population-based study*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(4): p. 3230-5.
33. Kukreja, M., et al., *Health-Related Quality of Life in Adult Survivors After the Fontan Operation*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2015. **27**(3): p. 299-306.
34. Pike, N.A., et al., *Quality of life, health status, and depression: comparison between adolescents and adults after the Fontan procedure with healthy counterparts*. *J Cardiovasc Nurs*, 2012. **27**(6): p. 539-46.
35. Uzark, K., et al., *Assessment of Quality of Life in Young Patients with Single Ventricle after the Fontan Operation*. *J Pediatr*, 2016. **170**: p. 166-172 e1.
36. van den Bosch, A.E., et al., *Long-term outcome and quality of life in adult patients after the Fontan operation*. *Am J Cardiol*, 2004. **93**(9): p. 1141-5.
37. Galantowicz, M. and J.P. Cheatham, *Fontan completion without surgery*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2004. **7**: p. 48-55.
38. Bacha, E.A., et al., *Expanding the hybrid concept in congenital heart surgery*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu*, 2007: p. 146-50.
39. Konertz, W., et al., *Modified hemi-Fontan operation and subsequent nonsurgical Fontan completion*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1995. **110**(3): p. 865-7.
40. Hausdorf, G., M. Schneider, and W. Konertz, *Surgical preconditioning and completion of total cavopulmonary connection by interventional cardiac catheterisation: a new concept*. *Heart*, 1996. **75**(4): p. 403-9.

41. Klima, U., et al., *A novel technique for establishing total cavopulmonary connection: from surgical preconditioning to interventional completion*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **120**(5): p. 1007-9.
42. Cheatham, J., et al., *The use of custom-made covered NuMed CP stents in the treatment of congenital heart disease*. Catheter Cardiovasc Interv, 2002. **57**: p. 100.
43. Konstantinov, I.E. and V.V. Alexi-Meskishvili, *Intracardiac covered stent for transcatheter completion of the total cavopulmonary connection: anatomical, physiological and technical considerations*. Scand Cardiovasc J, 2006. **40**(2): p. 71-5.
44. Konstantinov, I.E., et al., *A simple surgical technique for interventional transcatheter completion of the total cavopulmonary connection*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **129**(1): p. 210-2.
45. Halestrap, A.P., *What is the mitochondrial permeability transition pore?* J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(6): p. 821-31.
46. Taylor, R.W. and D.M. Turnbull, *Mitochondrial DNA mutations in human disease*. Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 389-402.
47. Wiesner, R.J., T.T. Kurowski, and R. Zak, *Regulation by thyroid hormone of nuclear and mitochondrial genes encoding subunits of cytochrome-c oxidase in rat liver and skeletal muscle*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(9): p. 1458-67.
48. Duchen, M.R., *Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology*. Mol Aspects Med, 2004. **25**(4): p. 365-451.
49. Ventura-Clapier, R., A. Kaasik, and V. Veksler, *Structural and functional adaptations of striated muscles to CK deficiency*. Mol Cell Biochem, 2004. **256-257**(1-2): p. 29-41.
50. Echtay, K.S., et al., *Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 96-9.
51. Stock, D., A.G. Leslie, and J.E. Walker, *Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase*. Science, 1999. **286**(5445): p. 1700-5.
52. Kao, M.C., et al., *Characterization and topology of the membrane domain Nqo10 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of Paracoccus denitrificans*. Biochemistry, 2003. **42**(15): p. 4534-43.
53. Sazanov, L.A., *Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain*. Biochemistry, 2007. **46**(9): p. 2275-88.
54. Bourgeron, T., et al., *Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency*. Nat Genet, 1995. **11**(2): p. 144-9.
55. Borisov, V.B., *Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies*. Mol Aspects Med, 2002. **23**(5): p. 385-412.
56. Wang, H. and G. Oster, *Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase*. Nature, 1998. **396**(6708): p. 279-82.
57. Wu, Z., et al., *Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1*. Cell, 1999. **98**(1): p. 115-24.
58. Leone, T.C., et al., *PGC-1alpha deficiency causes multi-system energy metabolic derangements: muscle dysfunction, abnormal weight control and hepatic steatosis*. PLoS Biol, 2005. **3**(4): p. e101.
59. Lin, J., et al., *Transcriptional co-activator PGC-1 alpha drives the formation of slow-twitch muscle fibres*. Nature, 2002. **418**(6899): p. 797-801.
60. Kressler, D., et al., *The PGC-1-related protein PERC is a selective coactivator of estrogen receptor alpha*. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 13918-25.
61. Scarpulla, R.C., *Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function*. Physiol Rev, 2008. **88**(2): p. 611-38.

62. Ekstrand, M.I., et al., *Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(9): p. 935-44.
63. Fisher, R.P. and D.A. Clayton, *Purification and characterization of human mitochondrial transcription factor 1*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(8): p. 3496-509.
64. McKelvey, T.G., et al., *Mechanisms of conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase in ischemic rat liver and kidney*. Am J Physiol, 1988. **254**(5 Pt 1): p. G753-60.
65. Babior, B.M., *NADPH oxidase: an update*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1464-76.
66. Krause, K.H., *Tissue distribution and putative physiological function of NOX family NADPH oxidases*. Jpn J Infect Dis, 2004. **57**(5): p. S28-9.
67. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
68. Morel, Y. and R. Barouki, *Repression of gene expression by oxidative stress*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 481-96.
69. Boveris, A., N. Oshino, and B. Chance, *The cellular production of hydrogen peroxide*. Biochem J, 1972. **128**(3): p. 617-30.
70. Balaban, R.S., S. Nemoto, and T. Finkel, *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell, 2005. **120**(4): p. 483-95.
71. Boveris, A. and B. Chance, *The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen*. Biochem J, 1973. **134**(3): p. 707-16.
72. Hansford, R.G., B.A. Hogue, and V. Mildaziene, *Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age*. J Bioenerg Biomembr, 1997. **29**(1): p. 89-95.
73. Mates, J.M., C. Perez-Gomez, and I. Nunez de Castro, *Antioxidant enzymes and human diseases*. Clin Biochem, 1999. **32**(8): p. 595-603.
74. Podda, M., et al., *Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinol, and ubiquinone*. J Lipid Res, 1996. **37**(4): p. 893-901.
75. Marnett, L.J., *Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde*. Mutat Res, 1999. **424**(1-2): p. 83-95.
76. Stadtman, E.R. and R.L. Levine, *Why have cells selected reactive oxygen species to regulate cell signaling events?* Hum Exp Toxicol, 2002. **21**(2): p. 83.
77. Beckman, K.B. and B.N. Ames, *Mitochondrial aging: open questions*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **854**: p. 118-27.
78. Bernardi, P., *Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition*. Physiol Rev, 1999. **79**(4): p. 1127-55.
79. Barbieri, E., et al., *Mitohormesis in muscle cells: a morphological, molecular, and proteomic approach*. Muscles Ligaments Tendons J, 2013. **3**(4): p. 254-66.
80. Ristow, M. and K. Schmeisser, *Mitohormesis: Promoting Health and Lifespan by Increased Levels of Reactive Oxygen Species (ROS)*. Dose Response, 2014. **12**(2): p. 288-341.
81. Chachques, J.C., et al., *Effect of latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty on ventricular function*. Circulation, 1988. **78**(5 Pt 2): p. III203-16.
82. Carpentier, A., J.C. Chachques, and P. Grandjean, *Cardiac Bioassist*. Bakken Research Centre ed. 1997.
83. Chachques, J.C., P.A. Grandjean, and A. Carpentier, *Latissimus dorsi dynamic cardiomyoplasty*. Ann Thorac Surg, 1989. **47**(4): p. 600-4.
84. Chachques, J.C., et al., *Atrial cardiomyoplasty after Fontan-type procedures*. Circulation, 1990. **82**(5 Suppl): p. IV183-9.

85. Arpesella, G., et al., *Activity-rest stimulation of latissimus dorsi for cardiomyoplasty: 1-year results in sheep*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(6): p. 1983-90.
86. Ianuzzo, C.D., et al., *Cardiomyoplasty: degeneration of the assisting skeletal muscle*. J Appl Physiol (1985), 1996. **80**(4): p. 1205-13.
87. Kashem, A., et al., *Vascular delay and intermittent stimulation: keys to successful latissimus dorsi muscle stimulation*. Ann Thorac Surg, 2001. **71**(6): p. 1866-73.
88. Carraro, U., et al., *Demand dynamic cardiomyoplasty: mechanograms prove incomplete transformation of the rested latissimus dorsi*. Ann Thorac Surg, 2000. **70**(1): p. 67-73.
89. Smeele, K.M., et al., *Reduced hexokinase II impairs muscle function 2 wk after ischemia-reperfusion through increased cell necrosis and fibrosis*. J Appl Physiol (1985), 2012. **113**(4): p. 608-18.
90. Metton, O., et al., *A new surgical technique for transcatheter Fontan completion*. Eur J Cardiothorac Surg, 2011. **39**(1): p. 81-5.
91. Hijazi, Z.M., *Intraoperative intervention (hybrid surgery) and intervention in the immediate perioperative period*. Catheter Cardiovasc Interv, 2003. **60**(1): p. 99-100.
92. Konstantinov, I.E., *Editorial comment. Transcatheter completion of Fontan circulation: primum non nocere!* Eur J Cardiothorac Surg, 2011. **39**(1): p. 85-6.
93. Boudjemline, Y., et al., *Feasibility of transcatheter techniques for intracardiac and extracardiac cavocaval connection in principle for Fontan completion in chronic animal models*. Eur J Cardiothorac Surg, 2013. **43**(4): p. 856-60.
94. Boudjemline, Y., et al., *Expandable right ventricular-to-pulmonary artery conduit: an animal study*. Pediatr Res, 2006. **59**(6): p. 773-7.
95. Anselmi, A., et al., *Myocardial ischemia, stunning, inflammation, and apoptosis during cardiac surgery: a review of evidence*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. **25**(3): p. 304-11.
96. Doenst, T., et al., *Three good reasons for heart surgeons to understand cardiac metabolism*. Eur J Cardiothorac Surg, 2008. **33**(5): p. 862-71.
97. Buckberg, G., et al., *Cardiac mechanics revisited: the relationship of cardiac architecture to ventricular function*. Circulation, 2008. **118**(24): p. 2571-87.
98. Lou, Q., et al., *Transmural heterogeneity and remodeling of ventricular excitation-contraction coupling in human heart failure*. Circulation, 2011. **123**(17): p. 1881-90.
99. van der Vusse, G.J., et al., *Transmural differences in energy metabolism of the left ventricular myocardium: fact or fiction*. J Mol Cell Cardiol, 1990. **22**(1): p. 23-37.
100. Gustafsson, A.B. and R.A. Gottlieb, *Heart mitochondria: gates of life and death*. Cardiovasc Res, 2008. **77**(2): p. 334-43.
101. Charles, A.L., et al., *Effect of postconditioning on mitochondrial dysfunction in experimental aortic cross-clamping*. Br J Surg, 2011. **98**(4): p. 511-6.
102. Brown, G.C. and V. Borutaite, *Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart*. Cardiovasc Res, 2007. **75**(2): p. 283-90.
103. Ziolo, M.T., M.J. Kohr, and H. Wang, *Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function*. J Mol Cell Cardiol, 2008. **45**(5): p. 625-32.
104. Schulz, R., M. Kelm, and G. Heusch, *Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2004. **61**(3): p. 402-13.
105. Barouch, L.A., et al., *Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms*. Nature, 2002. **416**(6878): p. 337-9.
106. Brahmajothi, M.V. and D.L. Campbell, *Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects*. Circ Res, 1999. **85**(7): p. 575-87.

107. Kindo, M., et al., *Pressure overload-induced mild cardiac hypertrophy reduces left ventricular transmural differences in mitochondrial respiratory chain activity and increases oxidative stress*. *Front Physiol*, 2012. **3**: p. 332.
108. Fink, B., S. Dikalov, and N. Fink, *ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function*. *Pharmacol Rep*, 2006. **58 Suppl**: p. 8-15.
109. Anderson, E.J. and P.D. Neuffer, *Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. **290**(3): p. C844-51.
110. Picard, M., et al., *Resistance to Ca<sup>2+</sup>-induced opening of the permeability transition pore differs in mitochondria from glycolytic and oxidative muscles*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008. **295**(2): p. R659-68.
111. MacDonald, J.R., et al., *Transmural differences in respiratory capacity across the rat left ventricle in health, aging, and streptozotocin-induced diabetes mellitus: evidence that mitochondrial dysfunction begins in the subepicardium*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(2): p. C246-55.
112. Hogg, N., *Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy*. *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(2): p. 122-9.
113. Moore, C.C., et al., *Three-dimensional systolic strain patterns in the normal human left ventricle: characterization with tagged MR imaging*. *Radiology*, 2000. **214**(2): p. 453-66.
114. Lima, B., et al., *S-nitrosylation in cardiovascular signaling*. *Circ Res*, 2010. **106**(4): p. 633-46.
115. Veal, E.A., A.M. Day, and B.A. Morgan, *Hydrogen peroxide sensing and signaling*. *Mol Cell*, 2007. **26**(1): p. 1-14.
116. Dedkova, E.N. and L.A. Blatter, *Characteristics and function of cardiac mitochondrial nitric oxide synthase*. *J Physiol*, 2009. **587**(Pt 4): p. 851-72.
117. Saraiva, R.M., et al., *Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium*. *Circulation*, 2005. **112**(22): p. 3415-22.
118. Khan, S.A., et al., *Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases*. *Circ Res*, 2003. **92**(12): p. 1322-9.
119. He, Y., et al., *Astragaloside IV inhibits oxidative stress-induced mitochondrial permeability transition pore opening by inactivating GSK-3 $\beta$  via nitric oxide in H9c2 cardiac cells*. *Oxid Med Cell Longev*, 2012. **2012**: p. 935738.
120. Opie, L.H., et al., *Controversies in ventricular remodelling*. *Lancet*, 2006. **367**(9507): p. 356-67.
121. Drazner, M.H., *The progression of hypertensive heart disease*. *Circulation*, 2011. **123**(3): p. 327-34.
122. Rimbaud, S., et al., *Stimulus specific changes of energy metabolism in hypertrophied heart*. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. **46**(6): p. 952-9.
123. Seddon, M., Y.H. Looi, and A.M. Shah, *Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure*. *Heart*, 2007. **93**(8): p. 903-7.
124. Takimoto, E. and D.A. Kass, *Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling*. *Hypertension*, 2007. **49**(2): p. 241-8.
125. Ventura-Clapier, R., et al., *Bioenergetics of the failing heart*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(7): p. 1360-72.
126. Ingwall, J.S., *Energy metabolism in heart failure and remodelling*. *Cardiovasc Res*, 2009. **81**(3): p. 412-9.

127. Zoll, J., et al., *Acute myocardial ischaemia induces specific alterations of ventricular mitochondrial function in experimental pigs*. Acta Physiol Scand, 2005. **185**(1): p. 25-32.
128. Murdoch, C.E., et al., *NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(2): p. 208-15.
129. Nabeebaccus, A., M. Zhang, and A.M. Shah, *NADPH oxidases and cardiac remodelling*. Heart Fail Rev, 2011. **16**(1): p. 5-12.
130. Griffiths, E.R., et al., *Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2010. **139**(6): p. 1609-17.
131. Jameel, M.N. and J. Zhang, *Myocardial energetics in left ventricular hypertrophy*. Curr Cardiol Rev, 2009. **5**(3): p. 243-50.
132. van Bilsen, M., F.A. van Nieuwenhoven, and G.J. van der Vusse, *Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental?* Cardiovasc Res, 2009. **81**(3): p. 420-8.
133. Cazorla, O., et al., *Transmural stretch-dependent regulation of contractile properties in rat heart and its alteration after myocardial infarction*. FASEB J, 2005. **19**(1): p. 88-90.
134. Duncker, D.J. and R.J. Bache, *Regulation of coronary blood flow during exercise*. Physiol Rev, 2008. **88**(3): p. 1009-86.
135. Sengupta, P.P., et al., *Left ventricular structure and function: basic science for cardiac imaging*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(10): p. 1988-2001.
136. van der Velden, J., et al., *Transmural heterogeneity of myofilament function and sarcomeric protein phosphorylation in remodeled myocardium of pigs with a recent myocardial infarction*. Front Physiol, 2011. **2**: p. 83.
137. Whitty, A.J., et al., *Transmural mitochondrial differences in myocardium*. Recent Adv Stud Cardiac Struct Metab, 1976. **11**: p. 349-54.
138. Kuznetsov, A.V., et al., *Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 965-76.
139. Veksler, V.I., et al., *Mitochondrial respiratory parameters in cardiac tissue: a novel method of assessment by using saponin-skinned fibers*. Biochim Biophys Acta, 1987. **892**(2): p. 191-6.
140. Zoll, J., et al., *ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction*. J Appl Physiol (1985), 2006. **101**(2): p. 385-91.
141. Duteil, D., et al., *The transcriptional coregulators TIF2 and SRC-1 regulate energy homeostasis by modulating mitochondrial respiration in skeletal muscles*. Cell Metab, 2010. **12**(5): p. 496-508.
142. Picard, M., et al., *Alterations in intrinsic mitochondrial function with aging are fiber type-specific and do not explain differential atrophy between muscles*. Aging Cell, 2011. **10**(6): p. 1047-55.
143. Anderson, E.J., et al., *Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(20): p. 1891-8.
144. Bouitbir, J., et al., *Mitochondria of trained skeletal muscle are protected from deleterious effects of statins*. Muscle Nerve, 2012. **46**(3): p. 367-73.
145. Srere, P.A., *Citrate synthase*, in *Methods in Enzymology*. 1969, Academic Press. p. 3-11.
146. Bouitbir, J., et al., *Opposite effects of statins on mitochondria of cardiac and skeletal muscles: a 'mitohormesis' mechanism involving reactive oxygen species and PGC-1*. Eur Heart J, 2012. **33**(11): p. 1397-407.

147. Abel, E.D. and T. Doenst, *Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy*. Cardiovasc Res, 2011. **90**(2): p. 234-42.
148. Majane, O.H., et al., *Dietary-induced obesity hastens the progression from concentric cardiac hypertrophy to pump dysfunction in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2009. **54**(6): p. 1376-83.
149. Mandavia, C.H., et al., *Over-nutrition and metabolic cardiomyopathy*. Metabolism, 2012. **61**(9): p. 1205-10.
150. Norton, G.R., et al., *The relationship between blood pressure and left ventricular mass index depends on an excess adiposity*. J Hypertens, 2009. **27**(9): p. 1873-83.
151. Hasegawa, T., et al., *Heterotopic vascularized murine cardiac transplantation to study graft arteriopathy*. Nat Protoc, 2007. **2**(3): p. 471-80.
152. Ocello, S., N. Salviato, and C.F. Marcelletti, *Results of 100 consecutive extracardiac conduit Fontan operations*. Pediatr Cardiol, 2007. **28**(6): p. 433-7.
153. Marcelletti, C.F., F.S. Iorio, and R.F. Abella, *Late results of extracardiac Fontan repair*. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 1999. **2**: p. 131-142.
154. Pan, J.Y., et al., *Early and intermediate-term results of the extracardiac conduit total cavopulmonary connection for functional single-ventricle hearts*. J Formos Med Assoc, 2016. **115**(5): p. 318-24.
155. Honda, T., et al., *Contributions of Respiration and Heartbeat to the Pulmonary Blood Flow in the Fontan Circulation*. Ann Thorac Surg, 2016.
156. Laranjo, S., et al., *The hybrid approach for palliation of hypoplastic left heart syndrome: Intermediate results of a single-center experience*. Rev Port Cardiol, 2015. **34**(5): p. 347-55.
157. Alsoufi, B., et al., *Hybrid management strategy for percutaneous Fontan completion without surgery: early results*. Ann Thorac Surg, 2011. **91**(2): p. 566-72; discussion 572-3.
158. Bridges, N.D., et al., *Effect of baffle fenestration on outcome of the modified Fontan operation*. Circulation, 1992. **86**(6): p. 1762-9.
159. Lemler, M.S., et al., *Fenestration improves clinical outcome of the fontan procedure: a prospective, randomized study*. Circulation, 2002. **105**(2): p. 207-12.
160. Malekzadeh-Milani, S., et al., *Closure of Fontan fenestration with the use of covered stents: short- and mid-term results in a cohort of 50 patients*. Cardiol Young, 2015. **25**(5): p. 868-73.
161. Atz, A.M., et al., *Late status of Fontan patients with persistent surgical fenestration*. J Am Coll Cardiol, 2011. **57**(24): p. 2437-43.
162. Imielski, B.R., et al., *Fontan fenestration closure and event-free survival*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013. **145**(1): p. 183-7.
163. Malekzadeh-Milani, S., et al., *Percutaneous valvulation of failing Fontan: rationale, acute effects and follow-up*. Arch Cardiovasc Dis, 2014. **107**(11): p. 599-606.
164. Santhanakrishnan, A., et al., *Hemodynamic effects of implanting a unidirectional valve in the inferior vena cava of the Fontan circulation pathway: an in vitro investigation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(10): p. H1538-47.
165. Vukicevic, M., et al., *Control of respiration-driven retrograde flow in the subdiaphragmatic venous return of the Fontan circulation*. ASAIO J, 2014. **60**(4): p. 391-9.
166. Neubauer, S., *The failing heart--an engine out of fuel*. N Engl J Med, 2007. **356**(11): p. 1140-51.
167. Smith, S.H., et al., *Regional changes in creatine kinase and myocyte size in hypertensive and nonhypertensive cardiac hypertrophy*. Circ Res, 1990. **67**(6): p. 1334-44.



168. Sonntag, M., et al., *Spatial heterogeneity of blood flow in the dog heart. I. Glucose uptake, free adenosine and oxidative/glycolytic enzyme activity.* Pflugers Arch, 1996. **432**(3): p. 439-50.
169. Camici, P., et al., *Different respiratory activities of mitochondria isolated from the subendocardium and subepicardium of the canine heart.* Basic Res Cardiol, 1984. **79**(4): p. 454-60.
170. Zoll, J., et al., *Physical activity changes the regulation of mitochondrial respiration in human skeletal muscle.* J Physiol, 2002. **543**(Pt 1): p. 191-200.
171. Sharov, V.G., et al., *Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure.* J Mol Cell Cardiol, 1998. **30**(9): p. 1757-62.
172. Arnold, S., *The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival.* Mitochondrion, 2012. **12**(1): p. 46-56.
173. Doenst, T., et al., *Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload.* Cardiovasc Res, 2010. **86**(3): p. 461-70.
174. Tran, T.N., et al., *Mitochondrial respiratory chain uncoupling, oxidative stress and skeletal muscle energetics.* Skeletal Muscle Physiol. Classif. Dis., 2012.
175. Faerber, G., et al., *Induction of heart failure by minimally invasive aortic constriction in mice: reduced peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator levels and mitochondrial dysfunction.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2011. **141**(2): p. 492-500, 500 e1.
176. Pimentel, D.R., et al., *Reactive oxygen species mediate amplitude-dependent hypertrophic and apoptotic responses to mechanical stretch in cardiac myocytes.* Circ Res, 2001. **89**(5): p. 453-60.
177. Bouitbir, J., et al., *Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress.* J Appl Physiol (1985), 2011. **111**(5): p. 1477-83.
178. Sano, M. and K. Fukuda, *Activation of mitochondrial biogenesis by hormesis.* Circ Res, 2008. **103**(11): p. 1191-3.
179. Babcock, G.T. and M. Wikstrom, *Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration.* Nature, 1992. **356**(6367): p. 301-9.
180. Elahi, M.M., K.M. Naseem, and B.M. Matata, *Nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the pathogenesis of cardiovascular disease.* FEBS J, 2007. **274**(4): p. 906-23.
181. Nishida, K., et al., *Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase.* J Clin Invest, 1992. **90**(5): p. 2092-6.
182. Woodman, C.R., et al., *Flow regulation of eNOS and Cu/Zn SOD mRNA expression in porcine coronary arterioles.* Am J Physiol, 1999. **276**(3 Pt 2): p. H1058-63.
183. Balligand, J.L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues.* Physiol Rev, 2009. **89**(2): p. 481-534.
184. Collman, J.P. and R.A. Decreau, *Functional biomimetic models for the active site in the respiratory enzyme cytochrome c oxidase.* Chem Commun (Camb), 2008(41): p. 5065-76.
185. Belevich, I., et al., *Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(8): p. 2685-90.
186. Ferguson-Miller, S., *Mammalian cytochrome c oxidase, a molecular monster subdued.* Science, 1996. **272**(5265): p. 1125.

187. Krab, K. and M. Wikstrom, *Principles of coupling between electron transfer and proton translocation with special reference to proton-translocation mechanisms in cytochrome oxidase*. Biochim Biophys Acta, 1987. **895**(1): p. 25-39.
188. Wikstrom, M. and M.I. Verkhovsky, *Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1767**(10): p. 1200-14.
189. Wikstrom, M.K. and H.T. Saari, *The mechanism of energy conservation and transduction by mitochondrial cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 1977. **462**(2): p. 347-61.
190. Decreau, R.A. and J.P. Collman, *Three toxic gases meet in the mitochondria*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 210.
191. Sipos, I., L. Tretter, and V. Adam-Vizi, *Quantitative relationship between inhibition of respiratory complexes and formation of reactive oxygen species in isolated nerve terminals*. J Neurochem, 2003. **84**(1): p. 112-8.
192. Beyar, R. and S. Sideman, *Left ventricular mechanics related to the local distribution of oxygen demand throughout the wall*. Circ Res, 1986. **58**(5): p. 664-77.
193. Bing, R.J., M.M. Hammond, and et al., *The measurement of coronary blood flow, oxygen consumption, and efficiency of the left ventricle in man*. Am Heart J, 1949. **38**(1): p. 1-24.
194. Jameel, M.N., et al., *Transmural distribution of metabolic abnormalities and glycolytic activity during dobutamine-induced demand ischemia*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008. **294**(6): p. H2680-6.
195. Rojas, J.C. and F. Gonzalez-Lima, *Low-level light therapy of the eye and brain*. Eye Brain, 2011. **3**: p. 49-67.
196. Sims, C.S., *Low-level laser therapy : A Literature review*. 2014.
197. Skourtis, S.S., *Review: Probing protein electron transfer mechanisms from the molecular to the cellular length scales*. Biopolymers, 2013. **100**(1): p. 82-92.
198. Karu, T.I., *Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation*. IUBMB Life, 2010. **62**(8): p. 607-10.
199. Wong, M.L. and L.G. Griffiths, *Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation: antigen removal vs. decellularization*. Acta Biomater, 2014. **10**(5): p. 1806-16.
200. Moser, P.T. and H.C. Ott, *Recellularization of organs: what is the future for solid organ transplantation?* Curr Opin Organ Transplant, 2014. **19**(6): p. 603-9.
201. Kubo, H., et al., *Creation of myocardial tubes using cardiomyocyte sheets and an in vitro cell sheet-wrapping device*. Biomaterials, 2007. **28**(24): p. 3508-16.

## Résumé

- Les cœurs univentriculaires sont des cardiopathies congénitales, non compatibles avec la vie. Fontan a transformé le pronostic de ces patients en restaurant une circulation pulmonaire passive. Malheureusement, le pronostic à long terme reste péjoratif.

Pour diminuer la morbi-mortalité de ces patients, nous avons développé un protocole chirurgical de pré-conditionnement, permettant une totalisation de Fontan percutanée adaptative aux résistances pulmonaires et aux capacités de travail du ventricule.

Nous avons pu observer que les chaînes respiratoires mitochondriales n'ont pas la possibilité d'adapter leur production énergétique face au travail. Le déséquilibre de la balance Nitroso-Redox engendrera le mitohormésis et l'hormésis, puis inéluctablement surviendra un remodelage myocardique mal adaptatif.

La seule possibilité pour améliorer le pronostic à long terme de ces patients sera d'augmenter les capacités oxydatives myocardiques du ventricule unique ou de créer une pompe pulmonaire.

Mots clés : Cœurs univentriculaires, Chirurgie de Fontan, Chirurgie hybride, Métabolisme énergétique, Mitochondries, Espèces radicalaires, Monoxyde d'azote.

## Résumé en anglais

- Univentricular hearts are congenital heart diseases, not compatible with life. Fontan transformed the prognosis of these patients by restoring a passive pulmonary circulation. Unfortunately, the long-term prognosis remains pejorative.

To reduce the morbidity and mortality of these patients, we developed a surgical preconditioning protocol, allowing a percutaneous Fontan totalization, adaptive to pulmonary resistance and to the working capacity of the ventricle.

We observed that the mitochondrial respiratory chains do not have the ability to adapt their energy production toward work. The disequilibrium of the Nitroso-redox balance will generate mitohormesis and hormesis, then will inevitably occur a poorly adaptive myocardial remodeling.

The only way to improve the long-term prognosis of these patients is to increase the myocardial oxidative capacities of the single ventricle or to create a pulmonary pump.

Keywords : Univentricular hearts, Fontan surgery, Hybrid surgery, Energetic metabolism, mitochondria, Radical species, Nitric oxide.