



HAL
open science

Mise au point de nouvelles méthodes d'analyse du traumatisme valvulaire des bioprothèses percutanées

Channing Convelbo

► **To cite this version:**

Channing Convelbo. Mise au point de nouvelles méthodes d'analyse du traumatisme valvulaire des bioprothèses percutanées. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0010 . tel-01737742

HAL Id: tel-01737742

<https://theses.hal.science/tel-01737742>

Submitted on 19 Mar 2018

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

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



THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

MENTION BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE

**Mise au point de nouvelles méthodes d'analyse du
traumatisme valvulaire des bioprothèses
percutanées.**

Présentée par Channing Convelbo

Dirigée par le Pr. Rachid Zegdi

Soutenue le 13 octobre 2017 devant le jury composé de

Pr. Thierry Folliguet
Pr. Antoine Lafont
Dr. Nicole Karam
Pr. Emmanuel Teiger
Pr. Rachid Zegdi

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements au Dr. Hervé Petite pour m'avoir accueilli au sein son équipe de recherche pendant ces 4 années de thèse. Mais aussi à Mr Eric Pérouse pour son encadrement et son soutien dans la réalisation de ces travaux.

Je tiens également à remercier très chaleureusement mon directeur de thèse, Pr. Rachid Zegdi, pour sa rigueur scientifique, son écoute et sa détermination. Je ne peux que vous être reconnaissant de m'avoir prit sous votre aile il y'a 6 ans pour mon Master 1 Recherche et donné l'opportunité de poursuivre mes travaux de recherche dans le cadre de ma thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres de mon jury de thèse. Je remercie très sincèrement le Pr. Antoine Lafont et le Pr. Thierry Folliguet d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Merci également, Dr. Nicole Karam et Pr. Emmanuel Teiger d'être examinateur de mon manuscrit. Je remercie sincèrement la société Cormove et l'ARNT sans qui la réalisation de ces travaux n'aurait pu se faire.

J'aimerais aussi remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire B2OA pour leurs conseils et leur soutien. Merci à Carole, Delphine, Ester, Fani, Gaëlle, Hanane, Marianne, Morad, Moustapha, Nathanaël et tous ceux que j'oublie.

Tout particulièrement, un grand merci à Cyprien Denoeud pour ses conseils et nos grandes discussions au bureau. Egalement un très grand merci à Adeline Bechet pour sa rigueur, son optimisme, et ses blagues. Ainsi qu'à Aurélien Bellanger pour son inventivité et sa franchise. Mais aussi à Clara Dubost pour son soutien indéfectible au cours de ces années et la relecture de ce manuscrit.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille, mes parents, qui m'ont soutenu en permanence et m'ont donné le courage de persévérer dans la réalisation de mes objectifs ; et en particulier ma sœur, Leslie, pour nos fous rire et son soutien infailible dans la réalisation de ces travaux et dans la vie.

Enfin à tous ceux qui ont été présents et m'ont donné beaucoup de force au cours de toutes ces années, Baz, Mehdi, Michael, Armel, Beny, Jojo, Osos, Dan, Bernie, Hero, Barber, Naïb, Pierre-Edouard et tous ceux que je n'ai pu citer.

RÉSUMÉ

Le remplacement valvulaire aortique percutané (TAVI) est une thérapie qui s'impose de plus en plus chez les patients porteurs d'une sténose aortique sévère. Toutefois, un nombre croissant d'études démontre que l'utilisation, crimping (sertissage) et déploiement, de ces bioprothèses induit une altération de la structure de leurs feuillets péricardiques. Ce qui soulève la question de la durabilité à long-terme de ces dispositifs.

Dans les travaux de cette thèse, nous avons développé des outils permettant d'analyser le traumatisme subi par les feuillets de péricardes.

La première stratégie visait à déterminer les différences de comportements des péricardes bovins et porcins en matière de diffusion vis à vis de différents solutés. Nous avons pu mettre en évidence que la perméabilité du péricarde porcine était plus élevée (en moyenne 5-fois) et plus hétérogène comparativement à celle du péricarde bovin.

La seconde stratégie consistait à caractériser, à l'aide des outils développés, les lésions traumatiques induites lors du déploiement des prothèses auto-expansibles ou déployables par inflation d'un ballon. Quelque soit le type de prothèses utilisées, une altération de la perméabilité membranaire des péricardes a été observée après leurs déploiements.

La dernière stratégie était de déterminer si le crimping de bioprothèses auto-expansibles pouvait entraîner une altération des propriétés mécaniques ainsi que la calcification plus importante des feuillets péricardiques. Un modèle d'évaluation de la calcification *in-vivo* chez le lapin a été utilisé. Cette étude a permis d'observer que le taux de calcium ainsi que la minéralisation du péricarde n'étaient pas affectés par le crimping.

Mots-Clés : Péricarde, Conductance Hydraulique, Porcine, Bovine, TAVI, Sertissage.

RESUME

Transcatheter aortic valve replacement (TAVR) is a growing therapy indicated to treat severe aortic valve stenosis. However, an increasing number of studies demonstrated that crimping and deployment of these bioprotheses induce structural alterations of the pericardial leaflets. These observations raise interrogations concerning the long-term durability of these devices.

In this thesis works, we developed tools to analyze pericardial leaflets injuries.

The first strategy consisted to determine the differences between bovine and porcine pericardium toward the filtration of various solute. It was possible to observe that porcine pericardium hydraulic conductance was higher (5-folds) and more heterogeneous than bovine pericardium.

The second strategy consisted to characterize the injuries induced by deployment of self and balloon-expandable valved-stents. After deployment, both types of valved-stents showed an alteration of their pericardial hydraulic conductance.

The last strategy was to determine if self-expandable valved-stents crimping could alter their pericardial leaflets mechanical properties and calcification. The rabbit model was used as an *in-vivo* evaluation model. This study showed that the calcium concentration and tissular mineralization of the pericardial leaflets were unaffected by valved-stents crimping.

Keywords: Pericardium, Hydraulic Conductance, Porcine, Bovine, TAVI, Crimping.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
1. Cœur et valvules cardiaques	1
1.1. Le cœur.....	1
1.2. Les valvules.....	2
1.2.1. La valve tricuspide	2
1.2.2. La valve pulmonaire	2
1.2.3. La valve mitrale	2
1.2.4. La valve aortique	3
2. Sténose Aortique	5
2.1. Epidémiologie	5
2.2. Physiopathologie	6
2.3. Causes	7
2.4. Mécanismes de la dégénérescence valvulaire	8
2.5. Traitements	10
3. Prothèses valvulaires	11
3.1. Les prothèses mécaniques	11
3.2. Les bioprothèses.....	12
4. TAVI.....	15
4.1. Définition.....	15
4.2. Sertissage de la bioprothèse	16
4.3. Voies d'abord	16
4.3.1. Transfémorale	16
4.3.2. Transapicale	17
4.3.1. Sous-clavière	17
4.3.2. Transaxillaire	17
4.3.3. Carotide.....	17
4.4. Déploiement.....	18
4.5. Indications	18
4.6. Résultats.....	20
4.7. Limites	20
5. Le péricarde	21
5.1. Fonction.....	21
5.2. Anatomie.....	22
5.3. Structure.....	22
5.4. Propriétés mécaniques du péricarde	24
5.4.1. Définitions	24
5.4.2. Propriétés mécaniques du péricarde	27
5.5. Traitement au glutaraldéhyde.....	32
6. Calcification	34
6.1. Définition.....	34

6.2.	Mécanisme et régulation de la calcification.....	34
6.2.1.	Impact du glutaraldéhyde sur la calcification.....	36
6.2.2.	Effet des contraintes mécaniques sur la calcification	37
6.3.	Modèles d'étude de la calcification des bioprothèses	38
6.4.	Traitements anticalcifians.....	40
7.	Les Déchirures de feuillets	43
7.1.	Définitions	43
7.2.	Les Mécanismes	43
7.3.	Piste d'amélioration de la durabilité des feuillets.....	46
8.	Lésions induites par le sertissage et déploiement des bioprothèses percutanées	48
8.1.	Conséquences sur la structure et la mécanique du péricarde	48
8.2.	Conséquences biologiques du sertissage	52
8.2.1.	Calcification	52
8.2.2.	Thrombogénicité	52
8.3.	Données cliniques sur les détériorations bioprothétiques	54
	OBJECTIF DE L'ÉTUDE	58
	ETUDE 1.....	61
	Comparison of tissular permeabilty between porcine and bovine pericardium.....	63
	ETUDE 2.....	85
	Traumatic leaflet injury: Comparison of porcine leaflets self-expandable and bovine leaflets balloon-expandable prostheses.....	87
	ETUDE 3.....	112
	Study of leaflets elasticity and calcification following crimping of porcine pericardium self- expandable prostheses	114
	DISCUSSION.....	135
	CONCLUSION	143
	REFERENCES	144

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Coupe frontale du coeur.....	1
Figure 2: Coupe transversale supra-annulaire.....	3
Figure 3: A) Coupe sagittale d'un feuillet d'une valve aortique; B) Architecture cellulaire de la valve aortique. (Vesely 1998, Rajamannan 2011).....	4
Figure 4: Schémas d'une valve aortique normale (gauche) et sténosée (droite).....	6
Figure 5: Les stades de la sténose aortique. (Rashedi & Otto 2015).....	7
Figure 6: Représentation schématique des bicuspidies et leurs sous-catégories. (Sievers & Schmidtke 2007).....	8
Figure 7: Pathophysiologie de la sténose aortique. (Pawade et al. 2015).....	9
Figure 8: Photographies de prothèses valvulaires mécaniques. (Tillquist & Maddox 2011).....	11
Figure 9: Photographie d'une bioprothèse valvulaire bovine Edwards (A); porcine Medtronic (B); porcine stentless Medtronic (C).	14
Figure 10: Différents types de bioprothèses percutanées. (Kheradvar et al. 2015).....	16
Figure 11: Procédures pré et post-opératoires chez les patients candidats à la TAVI. (Otto <i>et al.</i> 2017)	19
Figure 12: Coupe sagittale du sac péricardique.....	22
Figure 13: Section histologique du péricarde. (Ishihara et al. 1980).....	23
Figure 14: Cartographie de l'épaisseur (gauche) et du degré d'orientation des fibres de collagène (droite) en fonction de la zone du sac péricardique. (Hiester & Sacks 1998b).....	24
Figure 15: Machines de traction uniaxiale (A); biaxiale (B) et multiaxiale (C). (Lanir & Fung 1974a, Naimark et al. 1992, Nielsen et al. 2002).....	27
Figure 16: Courbe typique de contrainte/déformation du péricarde bovin. (Radjeman et al. 1985) ..	28
Figure 17: A) Représentation vectorielle de l'orientation des fibres de collagène en fonction du côté droit ou gauche du sac péricardique bovin; B) Courbes de contrainte/déformation du péricarde bovin selon l'orientation des fibres. (Sacks et al. 1994)	29
Figure 18: Histogramme des épaisseurs du péricarde en fonction de l'espèce. (Naimark et al. 1992)	30
Figure 19: Courbe de relaxation de contrainte de différentes sources de péricardes. (Naimark et al. 1992).....	31
Figure 20: Les différentes formes du glutaraldéhyde en solution aqueuse (Jayakrishnan & Jameela 1996).....	33
Figure 21: Bioprothèse chirurgicale explantée présentant des calcifications sur sa face aortique (droite) et ventriculaire (gauche). (Saxena et al. 2014)	34
Figure 22: Différents types de lésions bioprothétiques. (Ishihara et al. 1981a).....	43
Figure 23: Flux hémodynamique à travers la valve aortique. (Rajamannan 2011)	44
Figure 24: Simulation en FEA d'un bioprothèse valvulaire en péricarde bovin (A) et porcine (B) avec la répartition des zones de contrainte maximale. (Li & Sun 2010)	45
Figure 25: Simulation en FEA des contraintes et déformations subit par les feuillets de péricarde sous différentes configurations elliptiques Scénario 1 avec (A) une excentricité de 0,30, (B) de 0,50 et (C) de 0,68; Scénario 2 avec (D) une excentricité de 0,30, (E) de 0,50 et (F) de 0,68. (Sun et al. 2010)..	47
Figure 26: Sections histologiques de péricarde bovin provenant de valve SAPIEN non crimpés (A) et crimpés (B) et (C). (Zegdi et al. 2011)	48
Figure 27: Photographie de péricarde crimpés (A) et non crimpés (B). (de Buhr et al. 2012).....	49

Figure 28: Images en microscopie électronique à balayage de péricarde bovin non crimpés (A), (C), (E) et crimpés (B), (D), (F) à différents diamètres (Alavi et al. 2014).	50
Figure 29: A) Coupe d'une capsule de TAVI ; B) Simulation des contraintes subites par les feuillets en fonction de leurs épaisseurs. BP : Bovine Pericardium, PP : Porcine Pericardium. (Li & Sun 2010).	51
Figure 30: Scanner de différents types de bioprothèses porteurs de thromboses. (A-C) CoreValve ; (D-F) Portico; (G-I) SAPIEN-XT ; (J-L) Carpentier-Edwards.	53
Figure 31: Causes de détérioration structurelle des bioprothèses (Capodanno <i>et al.</i> 2017).	55
Figure 32: Valve SAPIEN présentant des calcifications massives sur un feuillet (Dvir <i>et al.</i> 2016).	55

LISTE DES ABRÉVIATIONS

LVOT	Left Ventricular Outflow Tract
VIC	Vascular Interstitial Cells
GAG	Glycoaminoglycanes
MMP	Matrix-Métalloprotease
LDL	Low Density Lipoprotein
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANK-L	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B - Ligand
TAVI	Transcatheter Aortic Valve Implantation
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
SALS	Small-Angle Light Scattering
MGP	Matrix-Gla Protein
TGF-α	Transforming Growth Factor Alpha
SDS	Dodécylsulfate de Sodium

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1. Cœur et valvules cardiaques

1.1. Le cœur

Le cœur est un organe fibro-musculaire assurant la circulation du sang à travers l'organisme. Il est constitué de quatre cavités, deux oreillettes (atrium) et deux ventricules. Sur une coupe frontale il est possible de distinguer deux parties séparées d'un septum, le cœur gauche et le cœur droit (Figure 1). Le sang riche en CO_2 provenant des tissus entre dans l'atrium droit par la veine cave supérieure et inférieure ainsi que le sinus coronaire. Au cours de la diastole, la contraction de l'atrium droit permet au sang de passer à travers la valve tricuspide pour aller dans le ventricule droit. En systole, le sang est éjecté à travers la valve pulmonaire dans les poumons via l'artère pulmonaire. Le sang enrichi en O_2 arrive dans l'atrium gauche par les veines pulmonaires. Pendant la diastole, le sang circule dans le ventricule gauche à travers la valve mitrale. En systole, le ventricule gauche se contracte pour envoyer le sang oxygéné dans l'organisme à travers la valve aortique.

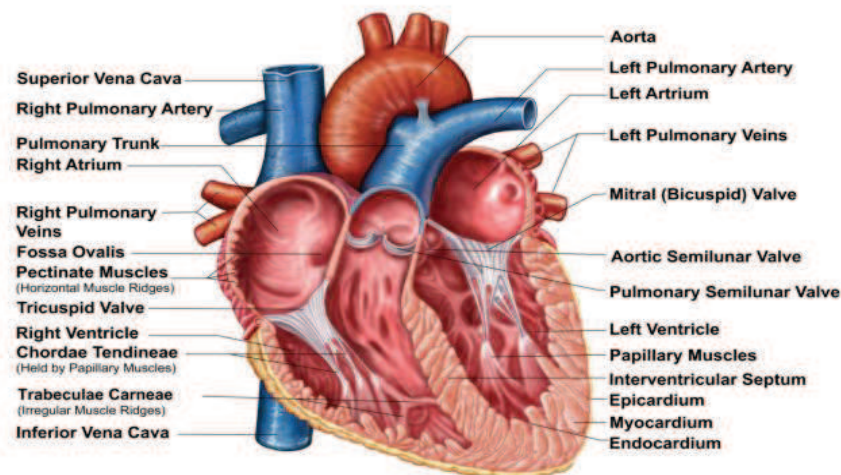


Figure 1: Coupe frontale du coeur

1.2. Les valvules

1.2.1. La valve tricuspide

La valve tricuspide se situe entre l'atrium droit et le ventricule droit (Figure 1). Elle permet d'empêcher le reflux du sang du ventricule vers l'atrium lors de la systole. La valve est constituée de 3 feuillets ayant une forme grossièrement triangulaire. Ces feuillets sont dits septal, antéro-supérieur et inférieur (Martinez *et al.* 2006). Le feuillet antéro-supérieur est le plus grand et contribue largement au fonctionnement de la valve (Muresian 2016). Un « appareil de tension » supporte les commissures des trois feuillets. Cet appareil est constitué de cordages tendineux qui sont attachés sur les muscles papillaires, reliés au ventricule, présentant une variabilité morphologique (Restivo *et al.* 1989).

1.2.2. La valve pulmonaire

La valve pulmonaire est une valve semi-lunaire qui se situe entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire (Figure 1). Elle est constituée de trois feuillets et empêche le reflux du sang de l'artère pulmonaire vers le ventricule au cours de la diastole.

1.2.3. La valve mitrale

La valve mitrale est considérée comme un appareil composé de 4 éléments. Le feuillet antérieur et postérieur, les muscles papillaires qui proviennent des parois du ventricule gauche, les cordages tendineux faisant la connexion entre les muscles papillaires et les feuillets de la valve, et l'anneau mitral se situant entre la valve et l'atrium gauche (Figure 1). Les cordages tendineux préviennent le prolapsus des feuillets de la valve au cours de leur

fonctionnement. L'ouverture de la valve mitrale permet la circulation du sang de l'atrium gauche vers le ventricule gauche en diastole. Pendant la systole, la valve se referme empêchant le reflux du sang dans l'atrium gauche.

1.2.4. La valve aortique

1.2.4.1. Anatomie

La valve aortique est composée de 3 feuillets semi-lunaires attachés à la base de l'aorte, reliées au cœur par le LVOT. Les feuillets soutiennent à leur base 3 sinus de Valsalva qui sont des renflements de la partie initiale de l'aorte desquels naissent les artères coronaires gauche et droite (Figure 2). Cette organisation conduit à nommer les feuillets de la valve aortique en tant que feuillet gauche, droite et non coronarien. La ligne d'attachement des feuillets sur la paroi aortique décrit un anneau fibro-cartilagineux permettant de renforcer l'attachement de la valve à la paroi (Figure 2).

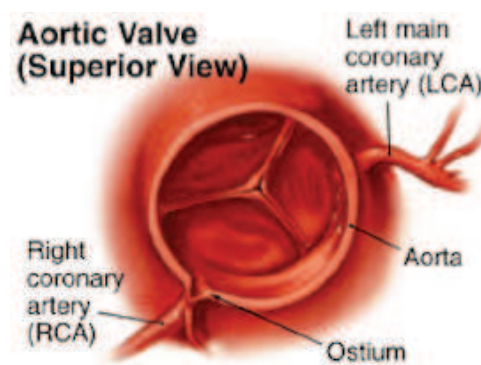


Figure 2: Coupe transversale supra-annulaire

1.2.4.2. Composition

Les feuillets de la valve aortique sont constitués de 3 couches en plus d'une fine couche endothéliale couvrant la surface extérieure des feuillets (Figure 3) (Gross & Kugel 1931). La fibrosa est faite d'un réseau dense de fibres collagènes de type I orientées dans la direction circonférentielle et d'une couche de cellules interstitielles (VIC). Cette organisation fibrillaire permet à cette couche de rigidifier le feuillet lors de son fonctionnement (Christie 1992, Vesely & Noseworthy 1992). La couche intermédiaire, la spongiosa est faite principalement de glycosaminoglycanes (GAG) et de VIC. Cette couche intermédiaire sert à réduire les contraintes de tension et de compression subies par le feuillet, en permettant par sa structure des glissements interne entre la fibrosa et la ventricularis (Vesely & Noseworthy 1992). La ventricularis recouvrant la partie ventriculaire des feuillets est constituée en grande partie d'élastine orientée dans la direction radiale et de cellules interstitielles. Cette architecture confère une large extensibilité radiale au feuillet pendant le cycle cardiaque et permet un retour élastique lorsque celui-ci n'est pas contraint (Vesely & Noseworthy 1992).

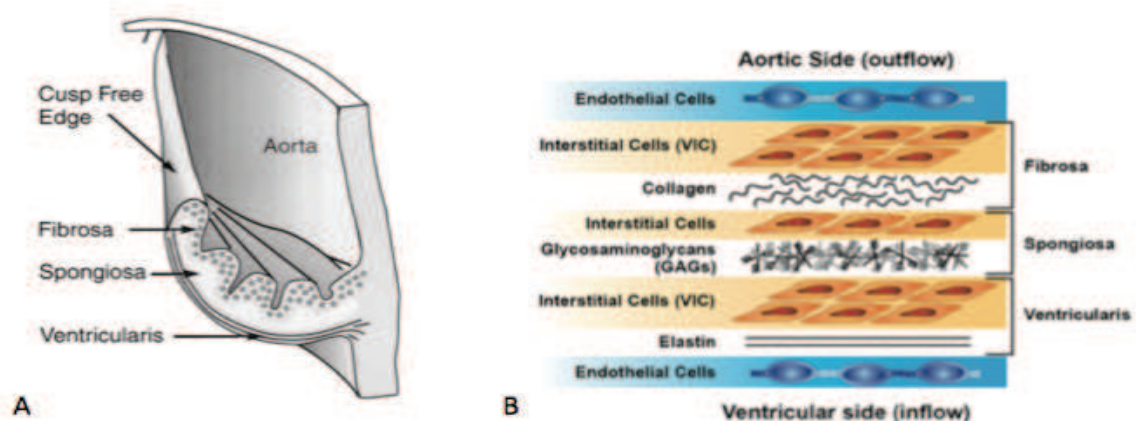


Figure 3: A) Coupe sagittale d'un feuillet d'une valve aortique; B) Architecture cellulaire de la valve aortique. (Vesely 1998, Rajamannan 2011).

Les cellules interstitielles sont abondantes dans toutes les couches des valves cardiaques et sont primordiales à leur fonctionnement. Les VIC ont pour rôle de synthétiser la matrice extracellulaire valvulaire mais aussi des enzymes de dégradation de la matrice (MMP et ses inhibiteurs), permettant un remodelage de ses composants (Aikawa *et al.* 2006). Elles constituent une population cellulaire dotée d'une grande plasticité puisqu'elles sont capables de moduler leurs phénotypes en réponse à des stimuli mécaniques ou chimiques (Liu *et al.* 2007). A l'âge adulte, les VIC ont des caractéristiques de fibroblastes quiescents ne présentant aucune activité de synthèse ou de dégradation de la matrice. Elles peuvent être activées lors de la maturation valvulaire intra-utérine, par des modifications des contraintes mécaniques mais également lors de processus pathologiques (Aikawa *et al.* 2006). Une fois activées, ces cellules peuvent se différencier en myofibroblastes ou ostéoblastes. Toutefois les ostéoblastes valvulaires répondent de manière différente que les ostéoblastes osseux aux stimuli cellulaires (Chen *et al.* 2009).

2. Sténose Aortique

2.1. Epidémiologie

La sténose aortique est une pathologie valvulaire répandue dont la prévalence continue d'augmenter en raison du vieillissement de la population générale (Nkomo *et al.* 2006, Osnabrugge *et al.* 2013). La sclérose aortique, par calcification et épaissement des feuillets de la valve aortique sans obstruction à l'éjection sortie du ventricule gauche, est fréquente chez les personnes âgées, affectant 21 à 26% des adultes de plus de 65 ans (Stewart *et al.* 1997, Otto *et al.* 1999). Lorsque les calcifications et l'épaississement des feuillets sont prononcés, la rigidification des feuillets conduit à une obstruction de la valve entraînant une sténose aortique chez 2 à 9% des personnes âgées (Stewart *et al.* 1997, Otto *et al.* 1999). La

prévalence de la sclérose et de la sténose aortique augmente avec l'âge, étant présent chez 48 et 4 %, respectivement, des adultes de plus de 85 ans (Otto et al., 1999).

2.2. Physiopathologie

Elle couvre un spectre de pathologie qui débute par une modification fibro-calcique des feuillets sans modification du diamètre de l'orifice, appelé sclérose aortique (Figure 4) (Pawade *et al.* 2015). La sclérose aortique évolue souvent vers une modification des feuillets conduisant à une obstruction à l'éjection du ventricule gauche. Pour compenser ce phénomène le ventricule gauche développe une hypertrophie afin de maintenir un volume d'éjection constant. Ceci provoque l'apparition d'un gradient de pression entre le ventricule gauche et l'aorte supposé quasi-nul à l'état physiologique. La présence de ce gradient entraîne une inadaptation du débit cardiaque à l'effort puis à une insuffisance cardiaque sur le long terme.

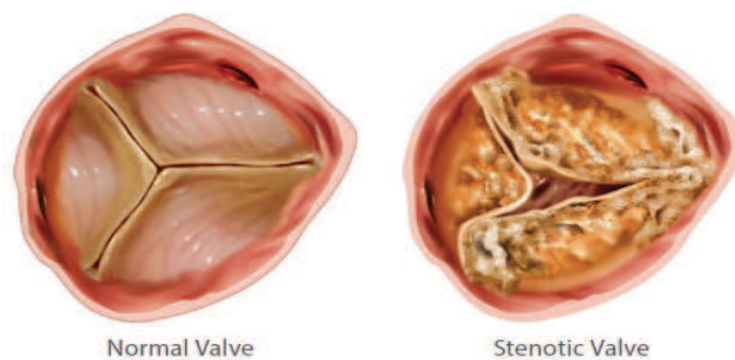


Figure 4: Schémas d'une valve aortique normale (gauche) et sténosée (droite).

En 2014, l'American Heart Association and American College of Cardiology (AHA/ACC) Valve Guidelines a introduit une nouvelle classification de la sténose aortique en 4 stades (Figure 5). Ces stades ont été définis en combinant les informations sur les symptômes des

patients, la structure des feuillets, les paramètres hémodynamiques de la valve ainsi que la fonction ventriculaire (Rashedi & Otto 2015).

Stage	Symptoms and severity	Aortic valve anatomy and hemodynamics
A	At risk of AS	Examples: aortic sclerosis or congenital bicuspid valve
B	Progressive AS (mild-moderate)	Mild AS: abnormal valve with V_{max} 2–2.9 m/s, mean $\Delta P < 20$ mm Hg Moderate AS: abnormal valve with reduced leaflet motion and V_{max} 3–3.9 m/s, mean $\Delta P < 20$ –40 mm Hg
C	Asymptomatic severe AS	Calcified and thickened leaflets with limited mobility and $V_{max} \geq 4.0$ m/s or mean $\Delta P \geq 40$ mm Hg (AVA usually < 1.0 cm ²) C1: normal LV systolic function C2: LV EF $< 50\%$ Very severe $V_{max} \geq 5.0$ m/s, mean $\Delta P \geq 60$ mm Hg
D	Symptomatic severe AS	Severely thickened and calcified aortic valve leaflets with reduced systolic opening with: D1: high gradient severe AS: $V_{max} \geq 4.0$ m/s or mean $\Delta P \geq 40$ mm Hg (AVA usually < 1.0 cm ² but not needed for diagnosis) D2: low-flow low-gradient severe AS (low EF): LV EF $< 50\%$ with a resting AVA < 1.0 cm ² and V_{max} 3 to 4 m/s. On low dose DSE there is a $V_{max} \geq 4.0$ m/s with an AVA < 1.0 cm ² at any flow rate D3: low-flow low-gradient severe AS (normal EF): V_{max} 3 to 4 m/s, AVA < 1.0 cm ² , indexed AVA < 0.6 cm ² /m ² , and indexed SV < 35 mL/m ² , all measured when patient is normotensive

Figure 5: Les stades de la sténose aortique. (Rashedi & Otto 2015)

2.3. Causes

Les principales causes de sténose aortique sont représentées par la bicuspidie aortique congénitale, le rhumatisme articulaire aigu et la dégénérescence valvulaire chez le sujet âgé. La bicuspidie aortique congénitale est la plus fréquente des malformations congénitales cardiaque avec une prévalence oscillant entre 0,5 et 2% dans la population générale (Braverman *et al.* 2005). La bicuspidie aortique consiste en une valve aortique avec deux feuillets au lieu des trois habituels. Le phénotype de cette malformation est très hétérogène puisqu'il existe une grande variabilité de fusion des feuillets (Angelini *et al.* 1989). La zone de fusion entre deux feuillets est appelée un raphé, dans la grande majorité des cas il y n'a qu'un seul raphé (Sievers & Schmidtke 2007) (Figure 6). Des travaux mettent en cause une fusion anormale des feuillets au cours du développement embryonnaire, toutefois les mécanismes de cette fusion restent peu connus (Sans-Coma *et al.* 1996, Braverman *et al.* 2005).










main category: number of raphes	0 raphe - Type 0		1 raphe - Type 1			2 raphes - Type 2
						
	21 (7)		269 (88)			14 (5)
1. subcategory: spatial position of cusps in Type 0 and raphes in Types 1 and 2	lat 13 (4)	ap 7 (2)	L - R 216 (71)	R - N 45 (15)	N - L 8 (3)	L - R / R - N 14 (5)
						

Figure 6: Représentation schématique des bicuspidies et leurs sous-catégories. (Sievers & Schmidtke 2007)

Le rhumatisme articulaire aigu est une conséquence inflammatoire tardive résultant d'une infection des voies aériennes supérieures par le streptocoque β -hémolytique du groupe A. Cette souche provoque une réponse auto-immune de l'organisme dirigée contre l'organisme du patient. Ce type d'infection reste rare dans les pays industrialisés mais possède une prévalence d'un enfant pour 1000 dans les pays d'Afrique sub-saharienne (Carapetis *et al.* 2005).

La dégénérescence valvulaire est la cause la plus répandue de sténose aortique. Les déterminants de cette pathologie sont le tabagisme, l'âge et l'hypertension (Stewart *et al.* 1997, Thanassoulis *et al.* 2010).

2.4. Mécanismes de la dégénérescence valvulaire

Malgré des études montrant l'implication des contraintes mécaniques et des lésions dans la physiopathologie de la maladie, la sténose aortique se développe par une série de processus et de mécanismes complexes. La sténose par dégénérescence peut se diviser en deux phases, une phase précoce dite d'initiation dominée par un dépôt lipidique, des lésions et de

l'inflammation. Dans la seconde phase dite de propagation, des facteurs pro-calcifiants et pro-ostéogéniques participent à la propagation de la maladie (Figure 7) (New & Aikawa 2011).

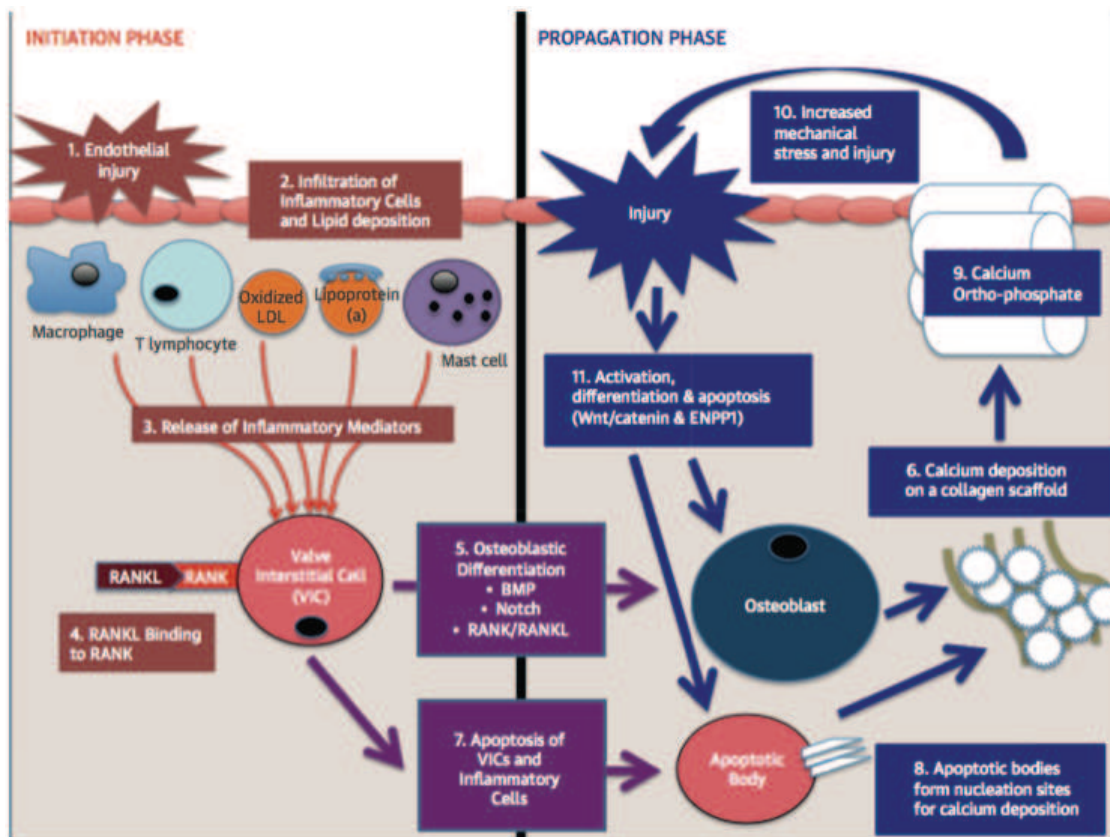


Figure 7: Pathophysiologie de la sténose aortique. (Pawade et al. 2015)

Au cours de la phase d'initiation, les lésions endothéliales dues aux modifications des contraintes mécaniques entraînent une infiltration lipidique, avec notamment, la lipoprotéine A et des LDL oxydés (Olsson *et al.* 1999, Demer 2001). La progression des lésions endothéliales et de l'oxydation lipidique conduit à une réponse inflammatoire dans les feuillets caractérisée par une infiltration de macrophages mais également de lymphocytes T et de mastocytes (Olsson *et al.* 1994, Otto *et al.* 1994). A ce stade, il est possible de distinguer une colocalisation des inclusions lipidiques et des sites de calcification.

Dans la phase dite de propagation, la libération de facteurs pro-inflammatoires active la différenciation ostéoblastique des cellules valvulaires interstitielles notamment via la fixation

de RANKL à son récepteur RANK (Kaden *et al.* 2004, Balachandran *et al.* 2010). L'activation des VIC conduit à un remodelage de la matrice extracellulaire avec une augmentation de la fibrose, un épaissement des feuillets de la valve ainsi qu'une angiogenèse et des calcifications supplémentaires menant à une détérioration valvulaire (Otto *et al.* 1994, Mohler *et al.* 2001, Soini *et al.* 2003). Les VIC peuvent également entrer en apoptose et libérer des corps apoptotique servant de site de nucléation du calcium, participant ainsi à une augmentation de la calcification des feuillets.

2.5. Traitements

Malgré de nombreux travaux mettant en évidence l'intérêt d'une thérapie basée sur une réduction des lipides circulant face à la progression de la maladie, plusieurs essais cliniques randomisés ont échoué à démontrer des modifications hémodynamiques ainsi qu'une amélioration du pronostic des patients (Rashedi & Otto 2015). Dans les cas symptomatiques sévères de sténose aortique où les traitements médicamenteux sont inefficaces, le remplacement valvulaire se révèle être la stratégie de choix.

3. Prothèses valvulaires

Chaque année 67.500 remplacements valvulaires chirurgicaux sont réalisés aux Etats-Unis (Clark *et al.* 2012). Avec l'augmentation de l'espérance de vie de la population générale et dont de la prévalence de la sténose aortique, le nombre de remplacement valvulaire devrait augmenter. Le remplacement valvulaire constitue le traitement de référence dans le cadre d'une sténose aortique sévère. Il reste le seul recours capable d'améliorer les symptômes et la qualité de vie des patients (Huang & Rahimtoola 2011). Le premier remplacement valvulaire aortique chez l'homme a été fait par D.E Harken en 1960 (Harken *et al.* 1962). Cette innovation a été suivie par la pose de la première bioprothèse porcine par Binet et Carpentier (Binet *et al.* 1966). Il existe aujourd'hui deux types de prothèses valvulaires, les mécaniques et les biologiques.

3.1. Les prothèses mécaniques

On distingue deux types de valves mécaniques, l'une dotée d'un disque à bascule et l'autre faite de deux « feuillets » métallique (Figure 8). Ces deux valves ont une durabilité équivalente. Elles nécessitent une prise d'anticoagulant à vie en raison de leurs risques d'accidents thromboembolique et ce, malgré la fonctionnalisation des surfaces de ces valves (Masters *et al.* 2001, Chaikof 2007).

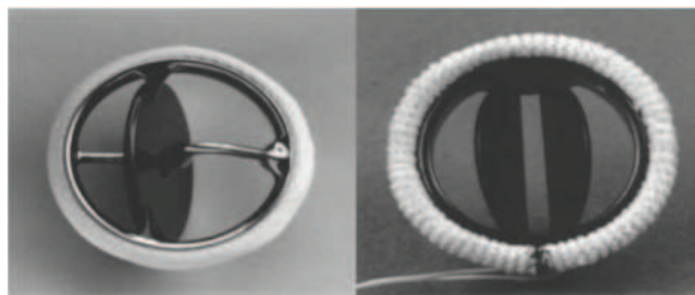


Figure 8: Photographies de prothèses valvulaires mécaniques. (Tillquist & Maddox 2011)

Les valves mécaniques ont une durabilité nettement supérieure à celle des bioprothèses qui est de 10-15 ans (Yacoub *et al.* 1995, Vongpatanasin *et al.* 1996). Dans une large étude comparant les valves mécaniques et les bioprothèses à 15 ans, les auteurs ont mis en évidence pour des patients de moins de 65 ans, un taux de dégénérescence pour les bioprothèses supérieur à celui des valves mécaniques (Hammermeister *et al.* 2000). Toutefois ce taux tend à diminuer chez les patients âgés de plus de 65 ans, démontrant donc l'intérêt des valves mécaniques chez des sujets moins âgés malgré les risques de saignement plus élevés (Hammermeister *et al.* 2000).

Même si ces valves sont plus durables que les bioprothèses, elles possèdent quelques limites. Le passage du sang au niveau de ces valves produit des contraintes de cisaillements sur les cellules sanguines susceptibles d'entraîner une activation des plaquettes et conduire à une thrombose à la surface de la valve. Ce phénomène a conduit les médecins prescrire à des anticoagulants tels que la warfarine aux patients (Chaikof 2007). Cependant même si cette thérapie reste très efficace dans la réduction de la thrombose, elle augmente fortement le risque d'hémorragie (Oxenham *et al.* 2003, Tillquist & Maddox 2011).

3.2. Les bioprothèses

Les bioprothèses sont entièrement ou partiellement constituées de matériaux biologiques. Dans l'usage clinique, il existe plusieurs sources de matériaux biologiques : l'homme (homogreffes), bovin ou porcine (xénogreffes). Les valves humaines constituent une bonne solution pour le remplacement valvulaire, mais la disponibilité reste un frein majeur à cette alternative. Toutefois dans certains cas il est possible de déplacer et implanter une valve du patient afin de remplacer la défectueuse. La procédure de Ross fait référence au déplacement

de la valve pulmonaire du patient afin de remplacer la valve aortique sténosée, la valve pulmonaire étant remplacée par une homogreffe.

La première xéno greffe/hétéro greffe a été réalisée par Binet et Carpentier sur 5 patients avec des valves porcines montées sur un stent de support (Binet *et al.* 1966). Malgré le succès de la procédure ces valves ont connu des détériorations structurelles. Par la suite Carpentier avec le traitement à la glutaraldéhyde, a permis d'améliorer la stabilité de la greffe et de réduire son immunogénicité en comparaison à d'autres stratégies (Carpentier *et al.* 1974). C'est en 1968 qu'il implante la première valve conservée à la glutaraldéhyde. A la suite de ce succès, la valve aortique porcine Carpentier-Edwards entre sur le marché en 1970. Depuis des améliorations ont été apportées afin d'augmenter la durabilité des bioprothèses, via le développement de traitements anticalcifians et l'élimination des sutures de suspension qui pouvaient conduire à des déchirures (Carpentier *et al.* 1984, Hilbert *et al.* 1992).

Il existe deux types de bioprothèses chirurgicales, les valves porcines et les valves péricardiques (bovines ou porcines) (Figure 9). Dans le cas des valves porcines, celles-ci sont directement prélevées du cœur d'un porc, tandis que pour les valves péricardiques, le sac péricardique porcine ou ovine est prélevé pour faire la valve. Chacun de ces deux types de valves peut être montées ou non sur un stent de support. Les valves non-stentées ont été conçues afin d'améliorer la biocompatibilité et la durabilité des tissus dont elles sont faites. Toutefois, la complexité de l'implantation ainsi que le temps nécessaire à la pose font que ce type de valve n'est pas souvent utilisée (Chambers 2014).

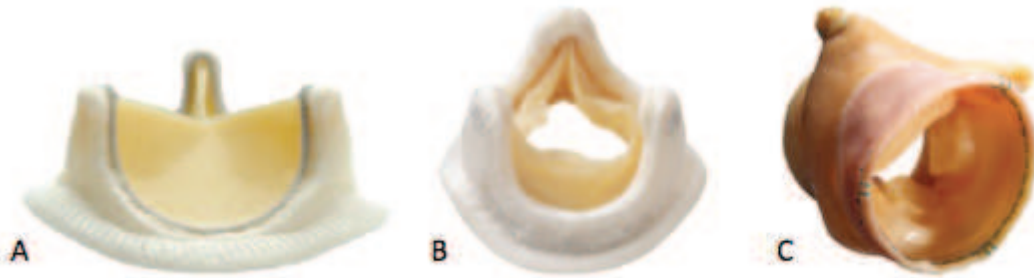


Figure 9: Photographie d'une bioprothèse valvulaire bovine Edwards (A); porcine Medtronic (B); porcine stentless Medtronic (C).

L'utilisation de tissus biologiques sur les bioprothèses permet d'obtenir un design de valve plus proche d'une valve native et donc un flux sanguin plus stable. Ce qui permet de réduire fortement la thrombogénicité que l'on observe sur les valves mécaniques, rendant la prise d'anticoagulant inutile (Rahimtoola 2003a, Tillquist & Maddox 2011).

Malgré un risque de thrombogénicité réduit, les bioprothèses sont moins durables que les valves mécaniques. On suppose que la dégénérescence structurelle des bioprothèses serait due à une accumulation de lipides et de calcium à la surface de la valve (Kulik *et al.* 2010). De plus, un rinçage incomplet du glutaraldéhyde de la bioprothèse avant son implantation serait susceptible de conduire à une détérioration de la valve par calcification et épaissement des feuillets (Carpentier 2010). Le glutaraldéhyde, solvant utilisé afin de réduire la réponse immunologique et de stabiliser les tissus de la bioprothèse, peut contribuer à la calcification des feuillets (Lee 2009). Le design des valves peut aussi constituer un facteur de dégénérescence, puisque des frottements entre le péricarde et le stent peuvent créer des déchirures (Siddiqui *et al.* 2009).

Pour la plupart des patients portant une bioprothèse, le risque de dégénérescence valvulaire est de l'ordre de 1,0% à 5 ans. A 10 et 15 ans après implantation, ce risque passe à 17% et

37% respectivement (Rahimtoola 2003b). Cette hausse du taux de détérioration entraîne également un taux de ré-opération supérieur à celui des valves mécaniques ; 25% contre 3%, respectivement (van Geldorp *et al.* 2009).

4. TAVI

4.1. Définition

Le remplacement valvulaire aortique par cathéter (TAVI), technique par laquelle une bioprothèse est insérée via un cathéter et implantée à l'intérieur de valve native pathologique a été réalisée pour la première fois par Andersen sur un modèle porcine (Andersen *et al.* 1992). Les auteurs ont réalisé une bioprothèse en montant une valve porcine sur un stent de support. Avant l'implantation, le stent-valve a été serti sur un cathéter à ballonnet. La bioprothèse ainsi montée, a été introduite de façon rétrograde jusqu'à l'aorte ascendante puis déployée par inflation du ballonnet sur la valve native. C'est en 2002 que l'équipe du Pr Alain Cribier réalise cette procédure chez l'homme, par voie antégrade transeptale, sur un patient ne pouvant subir un remplacement valvulaire chirurgical (Cribier *et al.* 2002). L'arrivée de cathéters plus flexibles, pouvant franchir la crosse aortique, a permis le développement de la voie rétrograde transfémoral qui est aujourd'hui utilisée.

Il existe sur le marché plusieurs modèles de valves percutanées, les deux principales sont : la valve Edwards SAPIEN-3 et la Medtronic CoreValve (Figure 10). La valve SAPIEN-3 est constituée de 3 feuillets de péricarde bovin montés sur un stent en acier inoxydable déployable par ballonnet. La CoreValve est constituée de 3 feuillets de péricarde porcine montés sur un stent auto-expansible en nitinol. Cette valve se déploie sur l'anneau aortique par le retrait progressif de la gaine du cathéter entourant la valve.

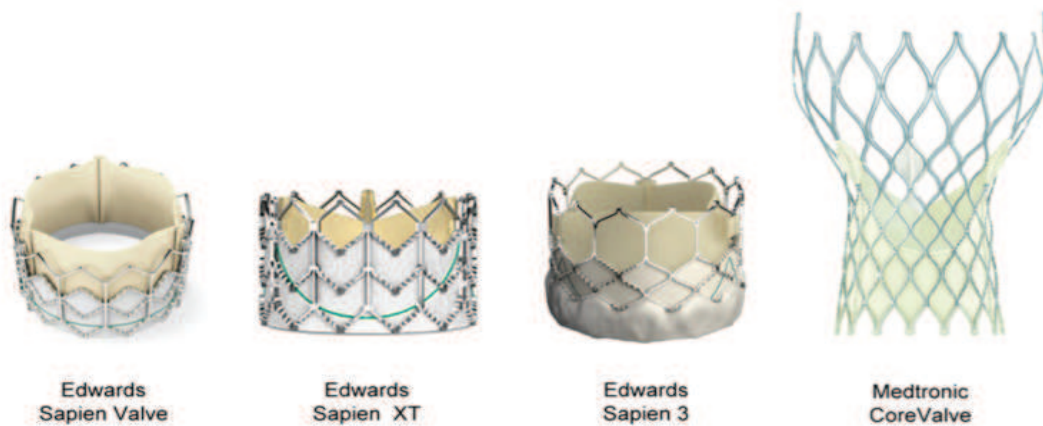


Figure 10: Différents types de bioprothèses percutanées. (Kheradvar et al. 2015)

4.2. Sertissage de la bioprothèse

Avant sa pose, la bioprothèse subit une étape dite de sertissage soit sur un cathéter à ballonnet soit pour son introduction dans une capsule de retenue. Ce processus permet de réduire le diamètre de la valve pour qu'elle puisse être délivrée via les différentes voies d'abord choisies. Actuellement le diamètre utilisé par les concepteurs de valve est de 14-16F, correspondant à une taille de 4.6-5.3mm.

4.3. Voies d'abords

Le remplacement valvulaire percutané peut être effectué par différentes voies d'abords.

4.3.1. Transfémorale

Il s'agit de la voie la plus fréquemment utilisée (80% des cas). Toutefois une évaluation rigoureuse des axes iliaques est nécessaire afin de déterminer la faisabilité de cette approche.

4.3.2. Transapicale

Cette procédure requiert une mini-thoracotomie (sous anesthésie générale) avec une ponction de l'apex du ventricule gauche. La voie transapicale a pour avantage de faciliter le positionnement de la bioprothèse sur la valve aortique. Cependant par son caractère invasif, cette voie d'abord peut conduire à des lésions myocardiques importantes (Rodes-Cabau 2011).

4.3.1. Sous-clavière

Cette procédure est notamment utilisée pour le système CoreValve et semble constituer une alternative robuste à la voie transapicale. L'artère sous-clavière gauche est généralement choisie car elle permet un meilleur positionnement du système de largage au niveau de l'anneau aortique. De plus le matériel nécessaire à la pose est le même que celui qui est employé pour la voie fémorale. Toutefois cette approche peut exposer le patient à des complications hémorragiques.

4.3.2. Transaxillaire

Cet accès est équivalent à la voie sous-clavière à la différence que la plaie axillaire pourra être réparée sans grande conséquence clinique contrairement aux vaisseaux sous-claviers.

4.3.3. Carotide

L'avantage de cette voie est la facilité d'accès de l'abord carotidien lors de l'intervention. Cet accès rend plus facile le positionnement de valve au niveau de l'anneau aortique. En effet, le trajet que doit faire le système de largage est plus direct et plus court.

4.4. Déploiement

Avant le déploiement de la valve, une valvuloplastie au ballonnet peut être réalisée. Le positionnement de la valve lors de l'implantation de la bioprothèse est primordial car il doit réduire le risque de migration de la prothèse et ainsi que le risque de troubles de la conduction intracardiaque. Si la valve est positionnée trop haute dans l'aorte, celle-ci peut s'emboliser et conduire à des régurgitations paravalvulaires, ou entraîner l'occlusion d'une ostie d'une artère coronaire. Dans d'autres cas un défaut de circularité peut également avoir lieu, puisque la bioprothèse est déployée sur les feuillets natifs de la valve aortique, souvent calcifiés (Sun *et al.* 2010, Zegdi *et al.* 2012). Ce défaut de circularité peut mener à des fuites paravalvulaires ou une dégénérescence prématurée de la valve par déchirure des feuillets provoquée par une répartition de contraintes inégales.

4.5. Indications

Avant la pose de la bioprothèse, plusieurs examens sont effectués afin d'optimiser le choix de la valve et de la voie d'abord (Figure 11). Une mesure de l'anneau aortique est faite au décours d'un angio-scanner de l'aorte thoracique. Cette donnée est capitale pour le choix de la valve qui est souvent surdimensionnée (2-5 mm). L'échocardiographie, quant à elle, sous-estime le diamètre de l'anneau par rapport au scanner dans 51% des cas (Tzikas *et al.* 2011, Wang *et al.* 2015). Une coronarographie est également faite pour détecter la présence d'une coronaropathie. Une analyse des axes iliaques est réalisée en récupérant les données concernant le diamètre, les tortuosités et le degré de calcification des artères iliaques pour déterminer la faisabilité de la procédure par voie fémorale.

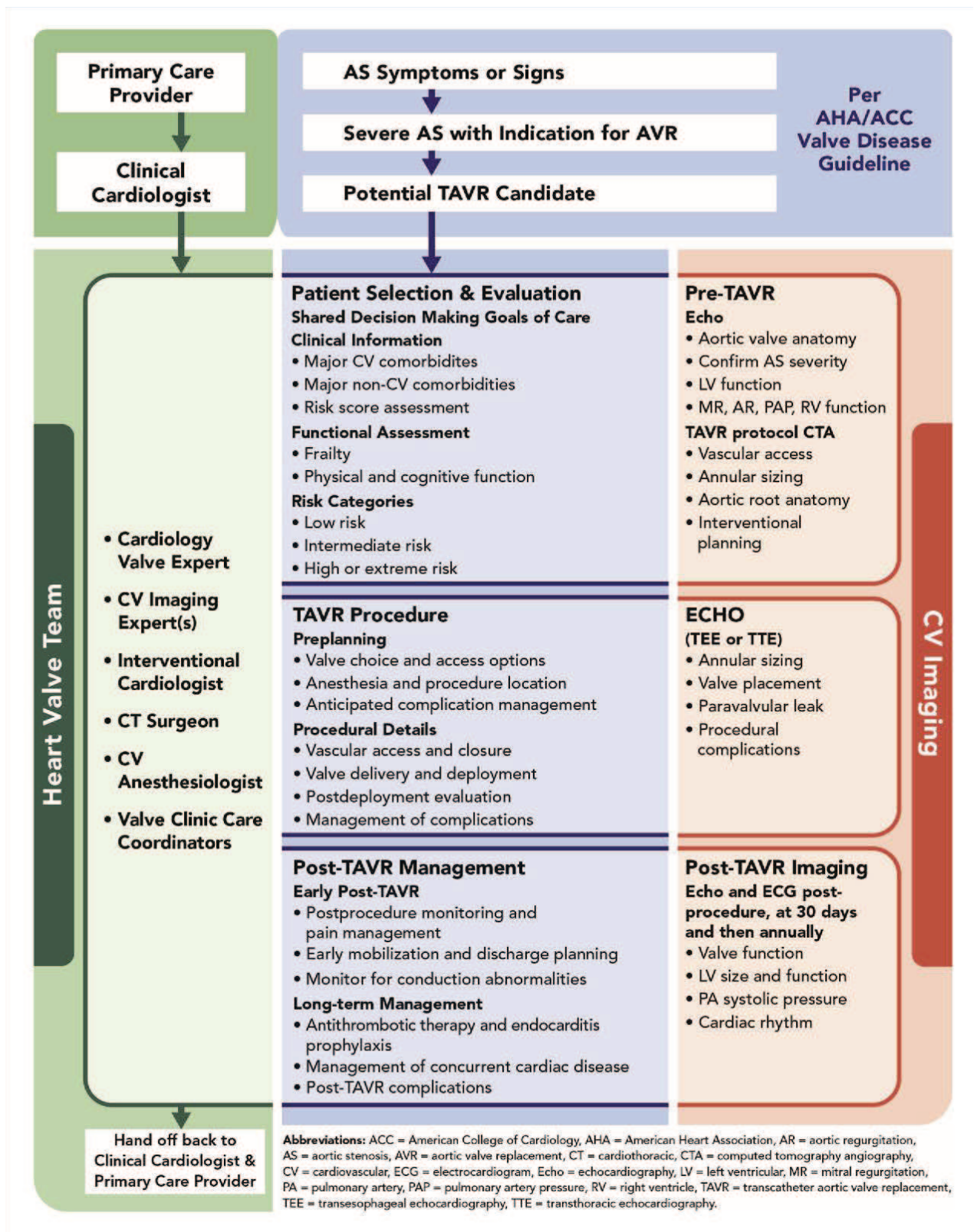


Figure 11: Procédures pré et post-opératoires chez les patients candidats à la TAVI. (Otto *et al.* 2017)

4.6. Résultats

Le remplacement valvulaire percutané est indiqué chez les patients porteurs d'une sténose aortique sévère avec une espérance de vie acceptable et ayant un risque chirurgical intermédiaire ou élevé. Ce risque est évalué par une 'Heart Team' (Vahanian *et al.* 2012).

L'étude PARTNER trial, portant sur les résultats à 5 ans après implantation, a pu démontrer la supériorité, en terme de mortalité cardiovasculaire, du remplacement valvulaire par voie fémorale sur la valvuloplastie chez des patients porteurs d'une sténose aortique sévère (Kapadia *et al.* 2015). Il a également été mis en évidence que la réalisation de cette procédure, par voie apicale ou fémorale, était pas inférieur au remplacement valvulaire chirurgical pour cette même catégorie de patients (Mack *et al.* 2015). Toutefois cette étude montre que le TAVI entraîne un risque de régurgitation aortique plus élevé que le remplacement chirurgical (14% contre 1%) (Mack *et al.* 2015). Une seconde étude sur les patients à risque intermédiaire porteurs d'une sténose aortique sévère, PARTNER 2 trial, a été réalisée. Les auteurs ont pu établir une absence d'infériorité entre le TAVI et le remplacement valvulaire chirurgical concernant l'incident des accidents vasculaires cérébraux et du décès à 2 ans après l'intervention chez les patients à risques intermédiaires (Leon *et al.* 2016).

4.7. Limites

L'extension de cette procédure à des patients à faibles risques ne pourra se faire qu'après la confirmation par des essais prospectifs randomisés d'un risque faible de complications précoces et tardives (complications hémorragiques, cérébrales, rythmologiques et valvulaires) ainsi que d'un risque de faible de détérioration prothétique tardive. Malgré un risque se situant entre 2 et 4%, la survenue d'un accident vasculaire cérébral est multifactorielle. Toutefois il semble qu'une grande partie des AVC péri ou post-procéduraux soient d'origines emboliques. L'imagerie par résonance magnétique, post-TAVI, a pu mettre en évidence des zones à faibles

diffusions chez 86% des patients ayant bénéficié d'un TAVI. Cependant ces zones ne semblent pas être associées à un quelconque évènement neurologique (Kahlert *et al.* 2010).

Des troubles de la conduction intracardiaque sont souvent observés à la suite d'un TAVI et pouvant conduire à la pose d'un pacemaker. Le taux de pacemaker post-TAVI est plus élevé lorsque le patient a reçu une valve CoreValve qu'une valve SAPIEN, suggérant le rôle du design du stent dans l'occurrence de ce phénomène (Eltchaninoff *et al.* 2011). Si le stent dépasse trop dans le ventricule gauche, contre le septum inter-ventriculaire, cela peut conduire à une altération de la conduction du signal. Il existe également des risques de régurgitation paravalvulaire principalement dus aux erreurs du « sizing » de l'anneau aortique, à l'importance des calcifications valvulaires ainsi qu'aux erreurs de positionnement des prothèses.

Malgré de bons résultats à 5 ans avec un taux de dégénérescence valvulaire très faible, la question de la durabilité à long-terme de ces bioprothèses reste présente. Des études récentes tendent à démontrer que le sertissage et le déploiement par ballonnet de la bioprothèse, seraient responsable d'altération de la structure des feuillets (Zegdi *et al.* 2011).

5. Le péricarde

5.1. Fonction

Le péricarde est une double membrane entourant le cœur, ayant plusieurs fonctions (Holt 1970).

- Il permet de maintenir le cœur au sein du thorax.
- Isole le cœur des autres structures du thorax.

- Empêche la dilatation des chambres ventriculaires et assure un niveau de pression transmural faible.
- Permet d'empêcher la dilatation du cœur pendant l'effort.

5.2. Anatomie

Il est constitué d'un feuillet profond entourant le cœur (péricarde viscéral) et d'un feuillet superficiel formant la paroi externe du péricarde (péricarde pariétal) (Holt 1970). Ces deux feuillets sont séparés par une cavité péricardique remplie d'un fluide permettant le glissement des deux couches l'une sur l'autre. Chacune de ces membranes est constituée d'une couche séreuse et d'une couche fibreuse (Figure 12).

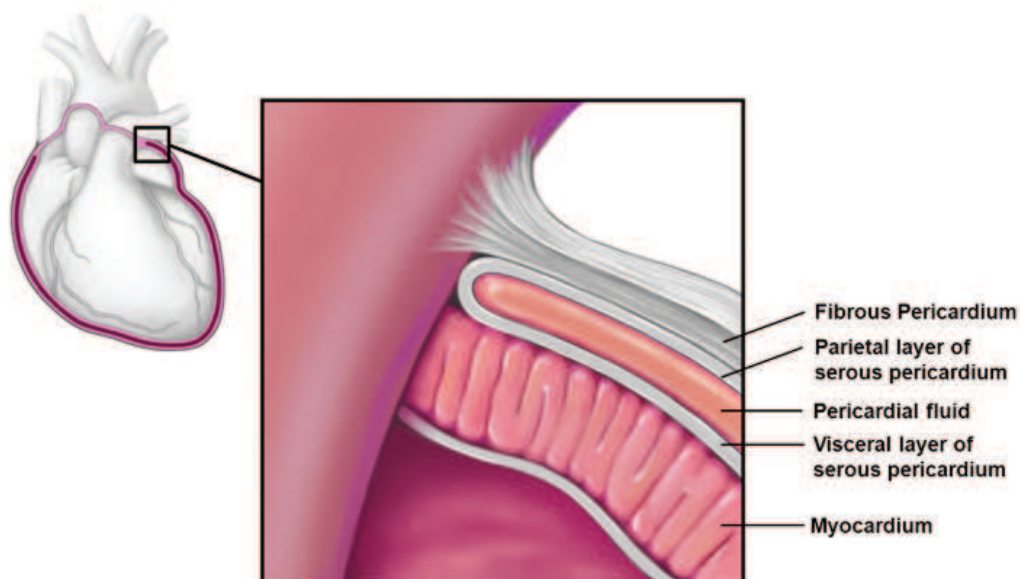


Figure 12: Coupe sagittale du sac péricardique.

5.3. Structure

Le péricarde séreux est couvert d'un mésothélium et d'une couche sous-mésothéliale (Holt 1970), tandis que le péricarde fibreux est constitué d'un tissu conjonctif dense (Elias & Boyd 1960). Des travaux ont mis en évidence la composition du péricarde, qui est faite en grande

partie de collagène de type I. On y trouve également une faible proportion de fibres d'élastines et de glycosaminoglycanes (Escande *et al.* 2011).

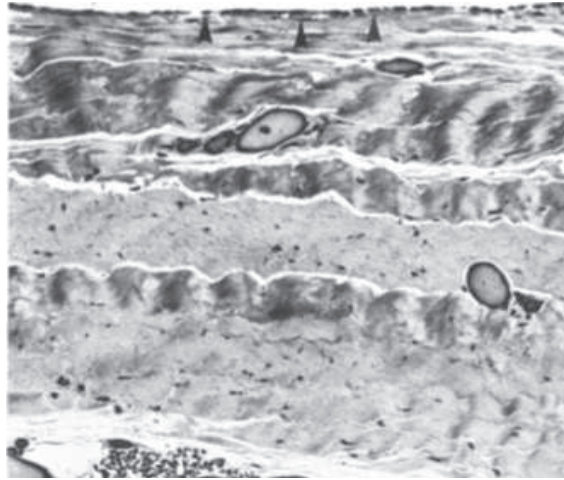


Figure 13: Section histologique du péricarde. (Ishihara *et al.* 1980)

Néanmoins, il existe des variations en fonction de l'espèce puisque le péricarde bovin est constitué à 90% de collagène, tandis que le porcine de 40% (Schoen *et al.* 1986, Braga-Vilela *et al.* 2008). Des études par Small-Angle Light Scattering (SALS) ont mis en évidence une architecture fibrillaire très variable au sein du même et entre différents péricardes de même origine (Sacks *et al.* 1994). Au sein du même sac péricardique, il est possible de distinguer plusieurs régions en fonction de l'orientation des fibres et de l'épaisseur du tissu (Figure 14) (Hiester & Sacks 1998b, Hiester & Sacks 1998a).

D'après la littérature, les régions se situant au niveau du ventricule gauche et de la partie supérieur du ventricule droit possèdent l'orientation de fibre la plus homogène. La région du ventricule gauche possède également la plus grande homogénéité d'épaisseur. Ce comportement permet notamment d'empêcher une sur-expansion du ventricule gauche lors de son fonctionnement. Ces résultats font de cette zone un site idéal de prélèvement pour la

conception d'une bioprothèse puisqu'elle offre la plus grande homogénéité de structure (Figure 14) (Simionescu *et al.* 1993, Sacks *et al.* 1994, Hiester & Sacks 1998a).

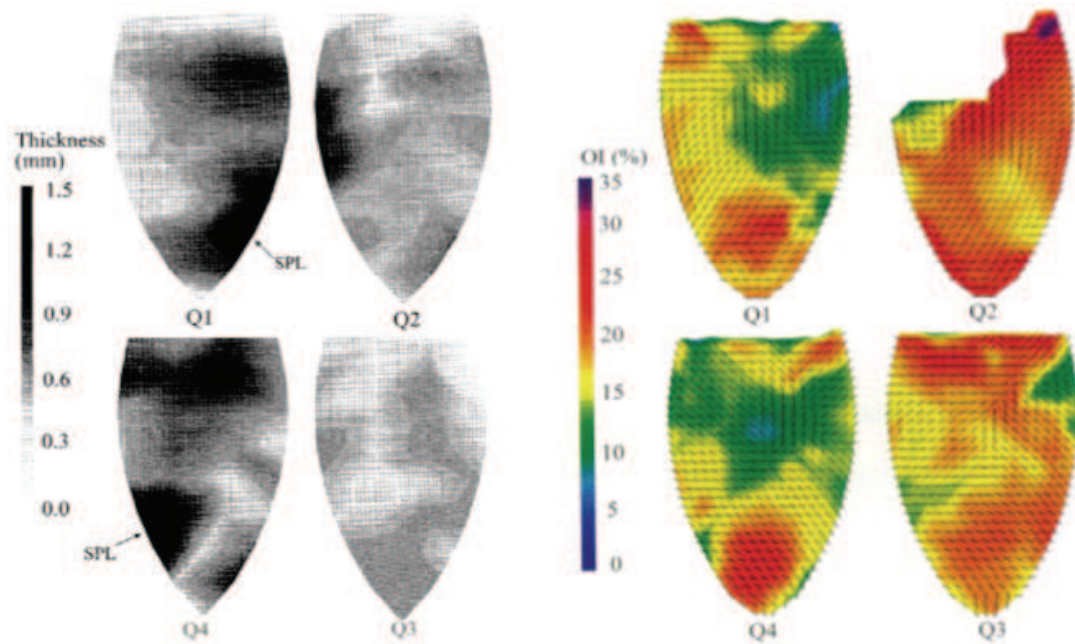


Figure 14: Cartographie de l'épaisseur (gauche) et du degré d'orientation des fibres de collagène (droite) en fonction de la zone du sac péricardique. (Hiester & Sacks 1998b)

5.4. Propriétés mécaniques du péricarde

5.4.1. Définitions

5.4.1.1. Contrainte/ Déformation

En mécanique, la contrainte fait référence à la force appliquée à un matériau rapportée à la section de celui-ci. Tandis que la déformation est la réponse mécanique de l'objet à la contrainte qui lui est appliquée.

5.4.1.2. Contrainte de compression/tension

Lors de la diastole, les feuillets de la valve aortique subissent des déformations de traction et des contraintes de compression par l'action de la pression sanguine sur la face aortique. L'abondance de fibre de collagène dans la fibrosa permet à la valve de supporter ces contraintes (Vesely & Noseworthy 1992).

5.4.1.3. Contrainte de cisaillement

Les contraintes de cisaillements font référence à des contraintes appliquées de manière tangentielle ou parallèle à la surface d'un matériau. C'est le résultat du déplacement d'une surface rapportée à la surface de l'objet. Au cours de la systole, la face ventriculaire des feuillets est soumise à des contraintes de cisaillements par l'action du frottement du sang sur les feuillets. Pendant la diastole, l'accumulation de sang par les sinus provoque également des contraintes de cisaillements.

5.4.1.4. Flexion

La flexion est un mouvement récurrent lors du fonctionnement d'une valve. Ce mouvement est principalement observé au niveau des commissures et du bord libre des feuillets d'une valve. Si la rigidité du feuillet tend à augmenter, ce qui peut être observé lors de certaines pathologies, les contraintes de flexion tendent également à augmenter et conduisent à une détérioration de la valve. Les zones subissant des flexions aiguës produisent de fortes contraintes sur les feuillets menant parfois à des déchirures (Vesely 1998).

5.4.1.5. Anisotropie

L'anisotropie caractérise la capacité d'un matériau à posséder plusieurs comportements mécaniques lorsque celui-ci est sollicité dans des directions différentes. Les feuillets issus de valves natives ou bioprothétiques sont des matériaux anisotropes.

5.4.1.6. Viscoélasticité

La viscoélasticité fait référence aux matériaux ayant les caractéristiques mécaniques d'un matériau visqueux (fluide) et d'un matériau élastique. Un matériau élastique a la capacité de conserver et restituer l'énergie qui lui a été appliquée à la suite d'une déformation. Tandis qu'un matériau visqueux est défini par sa capacité à dissiper l'énergie qui lui est appliquée. Ce comportement peut être observé lors d'essai de relaxation de contrainte. Quand le matériau est maintenu à un taux de déformation constant, la contrainte diminue au cours du temps jusqu'à un plateau. La grande majorité des tissus biologiques, les valves et bioprothèses valvulaires comprises, sont viscoélastiques.

5.4.1.7. Dispositifs de mesure

Des analyses mécaniques permettent de déterminer les propriétés physiques des matériaux. Des paramètres tel que la contrainte, la déformation ainsi que le module de Young relatif à l'élasticité d'un matériau, peuvent être mesurés. Ces informations servent à déterminer les équations constitutives du matériau permettant de décrire son comportement mécanique.

Ces mesures peuvent se faire selon un ou plusieurs axes (Figure 15). La détermination d'équations constitutives en 3-dimensions est requise puisque la majorité des tissus

biologiques sont sollicités selon 3 axes. Pour des tissus planaires tels que le péricarde ou la peau, le comportement en 3-dimensions peut être estimé en faisant des essais sur 2-dimensions grâce au principe d'incompressibilité de ces tissus (Lanir & Fung 1974a, Lanir & Fung 1974b). Cependant, cette méthode ne prend pas en compte les variations locales des propriétés mécaniques de ces tissus (Nielsen *et al.* 2002).

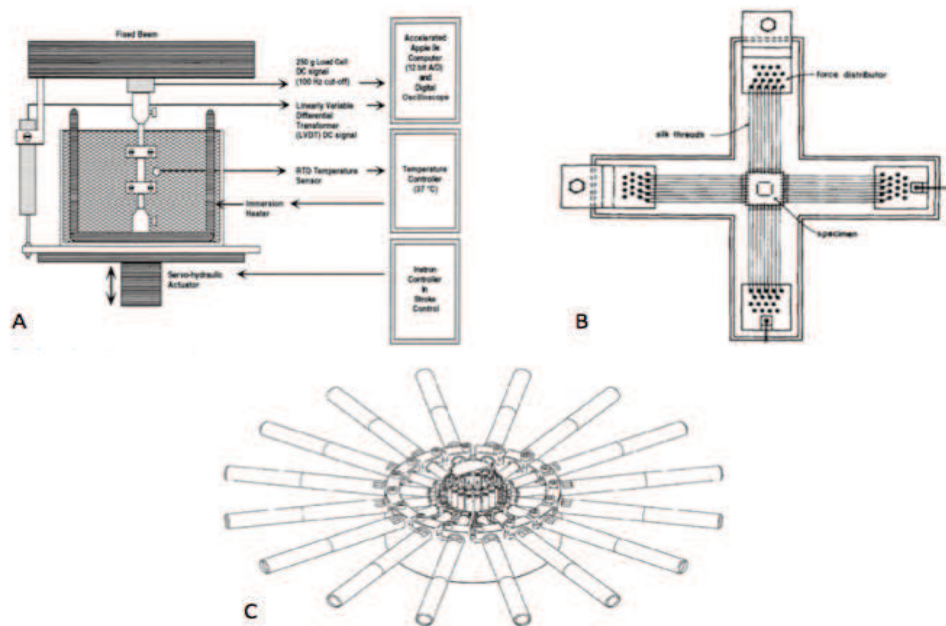


Figure 15: Machines de traction uniaxiale (A); biaxiale (B) et multiaxiale (C). (Lanir & Fung 1974a, Naimark *et al.* 1992, Nielsen *et al.* 2002)

5.4.2. Propriétés mécaniques du péricarde

Une des premières caractérisations mécaniques du péricarde bovin a été faite par l'équipe de Radjeman en 1985 (Radjeman *et al.* 1985). Ils ont pu distinguer la forme en J, typique du péricarde, de la courbe contrainte-déformation au cours de tests de traction uniaxial (Figure 16). Cette courbe traduit le comportement non-linéaire du péricarde, puisque l'extensibilité du tissu diminue avec l'augmentation de la déformation.

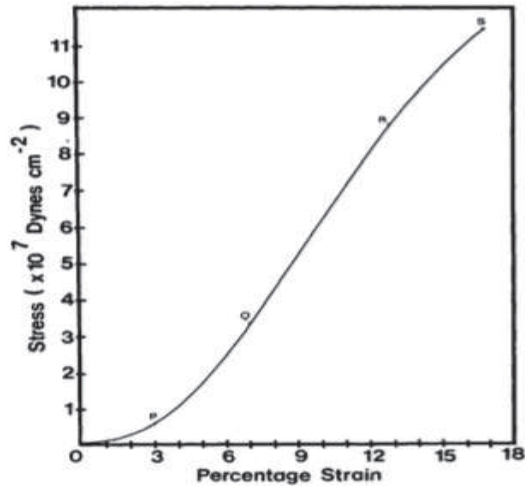


Figure 16: Courbe typique de contrainte/déformation du péricarde bovin. (Radjeman et al. 1985)

Ils ont pu également mettre en évidence l'anisotropie du péricarde qui, dans leur étude, était plus extensible lors d'un allongement vertical (radial) et moins extensible lors d'une élévation horizontale (circonférentiel) (Radjeman *et al.* 1985). La contrainte maximale à la rupture du péricarde était plus élevée pour les échantillons possédant une orientation de fibre circonférentielle. Cependant, certains de ces résultats sont en contradiction avec l'étude faite par l'équipe de Zioupos (Zioupos *et al.* 1992, Sacks *et al.* 1994). Dans un modèle d'essai hydraulique, leurs travaux confirment l'anisotropie du péricarde, mais suggèrent que l'orientation circonférentielle des fibres conduit à un allongement plus important du péricarde tandis que l'orientation base-apex des fibres entraîne une élévation plus faible. Ces résultats contraires peuvent être dus aux différences existantes entre les méthodes d'évaluation. On retrouve une concordance avec les résultats de Radjeman dans une étude utilisant de la traction biaxiale (Sacks *et al.* 1994). Dans cette étude, les auteurs ont pu observer deux comportements distincts selon la région du péricarde testée. La région se situant au niveau du ventricule gauche était la plus anisotrope, avec une forte rigidité circonférentielle et un comportement plus élastique dans le sens radial (Figure 17). Ce qui est expliqué par

l'orientation des fibres qui, dans cette zone, sont majoritairement dirigées dans le sens circonférentiel.

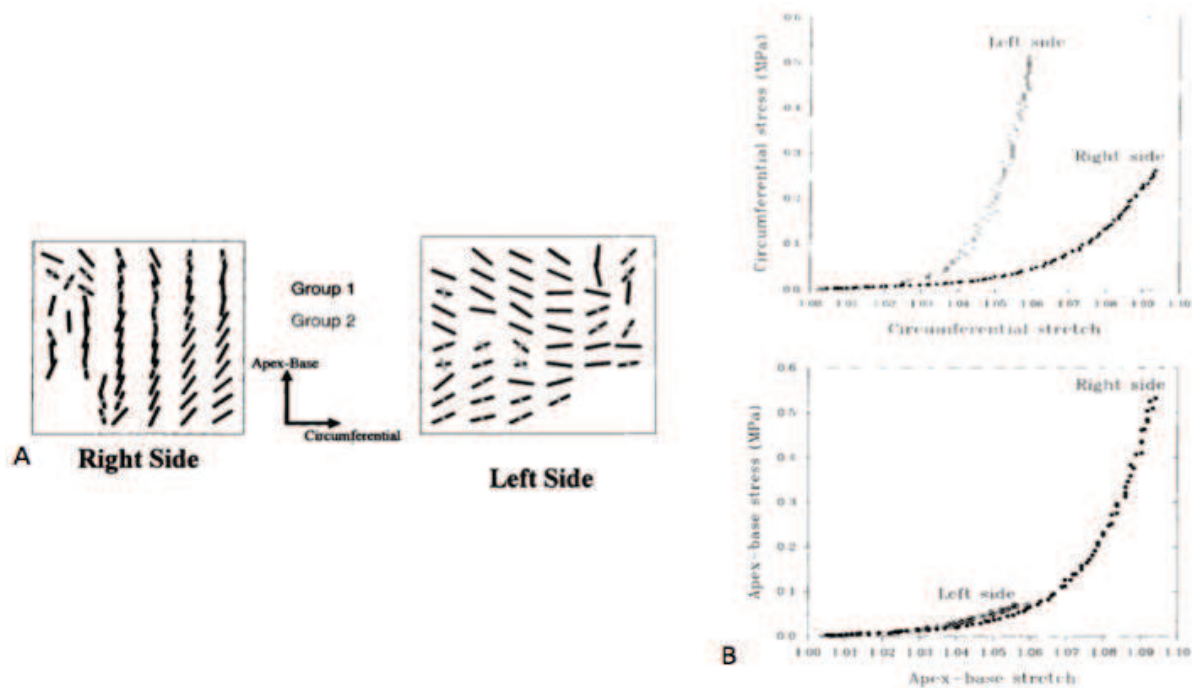


Figure 17: A) Représentation vectorielle de l'orientation des fibres de collagène en fonction du côté droit ou gauche du sac péricardique bovin; B) Courbes de contrainte/déformation du péricarde bovin selon l'orientation des fibres. (Sacks et al. 1994)

D'autres études portant sur la relaxation de contrainte ont permis de confirmer le caractère viscoélastique du péricarde lorsqu'il est soumis à de grandes déformations (Naimark *et al.* 1992, Mavrilas *et al.* 2005, Mendoza-Novelo *et al.* 2011). Cette propriété semble être due aux glycosaminoglycanes (GAG) inter-fibrillaires qui permettent de transférer les forces exercées dans la microstructure du péricarde (Redaelli *et al.* 2003, Shah & Vyavahare 2008, Mendoza-Novelo *et al.* 2011).

Des auteurs ont pu souligner les différences mécaniques inter-espèces qui pouvaient exister sur le péricarde. Le péricarde bovin est plus épais que le péricarde porcine mais semble posséder un module de Young plus faible que le porcine malgré son épaisseur (Figure 18) (Naimark *et al.* 1992). Toutefois ces résultats sont en opposition avec des travaux plus récents, dans lesquels les auteurs sur un modèle de traction uniaxiale, ont observé un module de Young ainsi qu'une contrainte à la rupture plus élevée chez le bovin (Gauvin *et al.* 2013). Ces différences peuvent s'expliquer encore une fois par la méthode de traction utilisée dans les deux études puisque dans la première les auteurs ont uniquement appliquée une charge de 80g (faible contrainte) sur le péricarde tandis que dans la seconde les tissus ont été contraints jusqu'à leur rupture. Dans une étude antérieure menée par l'équipe de Garcia-Paez, effectuée en traction uniaxiale jusqu'à rupture, les auteurs ont pu démontrer qu'il n'existait aucune différence en terme de contrainte maximale à la rupture entre les deux types de péricarde (Garcia Paez *et al.* 2003). Ces différences de résultats suggèrent le rôle de l'architecture fibrillaire du péricarde dans ses propriétés mécanique et soulignent l'importance des essais mécaniques multiaxiaux afin d'obtenir des résultats les plus fidèles possible.

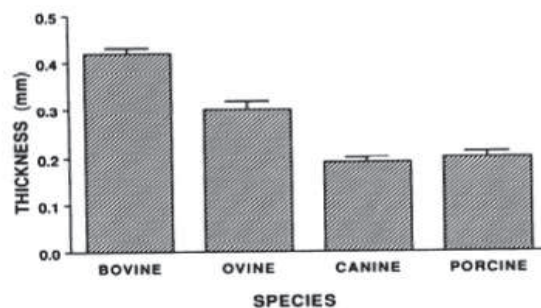


Figure 18: Histogramme des épaisseurs du péricarde en fonction de l'espèce. (Naimark et al. 1992)

Cette étude a également pu mettre en évidence une différence de comportement viscoélastique entre plusieurs sources de péricardes lors d'essais de relaxation de contrainte (Figure 19) (Naimark *et al.* 1992).

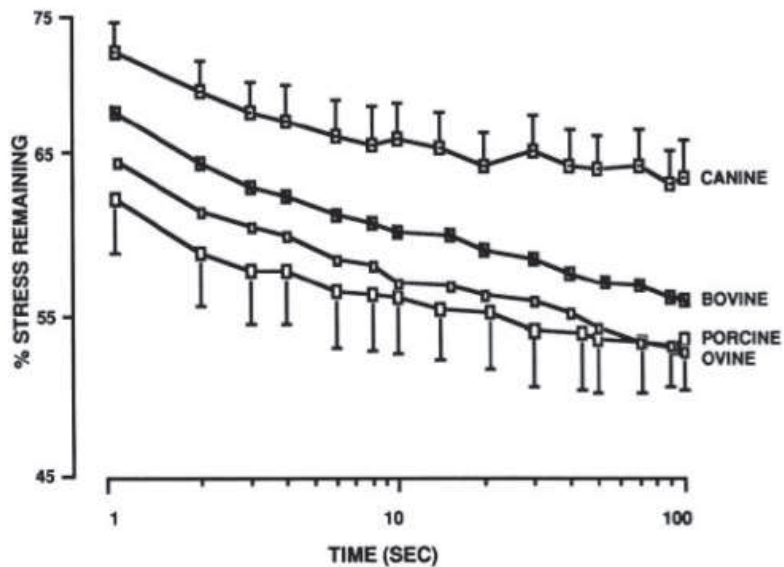


Figure 19: Courbe de relaxation de contrainte de différentes sources de péricardes. (Naimark *et al.* 1992)

L'âge de l'animal est également à considérer dans les propriétés mécaniques du tissu puisqu'une étude menée par l'équipe de Sizeland a pu établir une différence de comportement entre le péricarde bovin néonatal (4-7jours) et le péricarde adulte (Sizeland *et al.* 2014). Le péricarde néonatal est morphologiquement plus fin que le péricarde bovin. Des tests de traction uniaxiale ont pu établir que le néonatal possédait un module de Young 2,5 fois supérieur à celui de l'adulte ainsi qu'une contrainte maximale à la rupture plus élevée. Ces résultats s'expliquent en partie par l'orientation des fibres de collagène, puisque le péricarde néonatal possède plus de fibres orientées dans le même axe que l'adulte (Sizeland *et al.* 2014).

5.5. Traitement au glutaraldéhyde

Lors de la conception des bioprothèses, celles-ci sont traitées par une solution de glutaraldéhyde afin de réduire l'immunogénicité de leurs tissus (Gong *et al.* 1991, Jayakrishnan & Jameela 1996). Ce traitement permet de fixer les protéines connectives entre elles (Cheung & Nimni 1982, Cheung *et al.* 1985) et d'augmenter la rigidité du tissu notamment en flexion tout en conservant ses propriétés viscoélastiques malgré une légère baisse (Jayakrishnan & Jameela 1996, Mirnajafi *et al.* 2005). Le glutaraldéhyde induit une augmentation de l'épaisseur du tissu traité ainsi qu'une augmentation globale de son extensibilité et de sa rigidité aux faibles déformations (Reece *et al.* 1982, Lee *et al.* 1989, Sun *et al.* 2004). Il permet notamment une réduction de l'anisotropie du tissu après traitement. Il ne semble toutefois avoir aucun effet sur le module de Young et la contrainte maximale à la rupture (Lee *et al.* 1989, Langdon *et al.* 1999). Des travaux ont pu démontrer que la fixation par cette solution entraînait une augmentation de la résistance au cisaillement lorsque le tissu subit de faibles contraintes. Cette modification entraîne une hausse de la résistance à la flexion (Boughner *et al.* 2000). Au cours du fonctionnement d'une bioprothèse, les feuillets supportent des contraintes de flexion de manière répétitive. Pour qu'ils puissent se plier de façon homogène, des cisaillements internes sont requis. L'augmentation de la résistance à ces cisaillements peut conduire à des ruptures de faisceaux de collagène et une dégénérescence prématurée de la bioprothèse.

En solution aqueuse le glutaraldéhyde se présente sous forme d'aldéhyde libre, d'hémiacétal cyclique et de polymère insaturé (Figure 20). Le mécanisme précis de la fixation du collagène n'est pas complètement élucidé. L'hypothèse la plus répandue est la formation de liaisons covalentes inter et intramoléculaire par deux mécanismes. La formation d'une base de Schiff via la réaction d'un groupe aldéhyde avec un acide aminée lysine ou hydroxylysine. Ou par

condensation aldolique entre deux aldéhydes adjacents. La formation d'une liaison base de Schiff n'est pas très stable contrairement au produit de la condensation aldolique (Jayakrishnan & Jameela 1996).

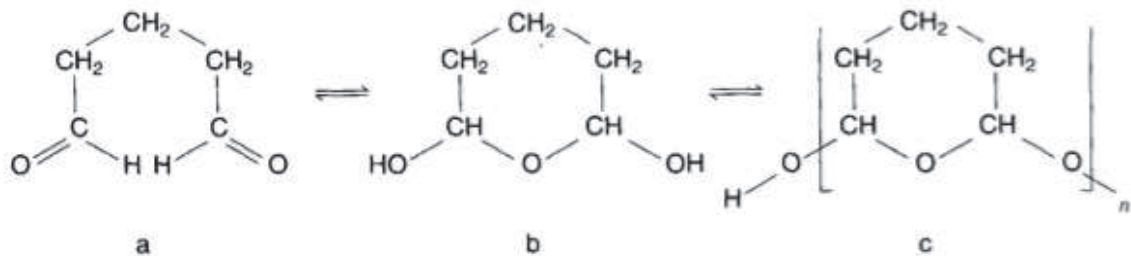


Figure 20: Les différentes formes du glutaraldéhyde en solution aqueuse (Jayakrishnan & Jameela 1996)

L'efficacité du traitement dépend de plusieurs paramètres tels que la pureté, la température, la période d'incubation, le pH et la pression de fixation (Golomb 1987, Liao *et al.* 1995, Duncan & Boughner 1998). La concentration joue également un rôle important, lorsqu'elle est faible la stérilisation est inefficace notamment contre certains types de mycobactéries, si elle est trop élevée le tissu tend à se rigidifier (Jayakrishnan & Jameela 1996).

Des études ont pu mettre en lumière l'effet cytotoxique du glutaraldéhyde sur la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tissus fibreux (Ishihara *et al.* 1981b, Schoen *et al.* 1986). Paradoxalement, l'absence de fixation à la glutaraldéhyde entraîne une réaction inflammatoire par défaut de stérilisation tandis que l'application du traitement seul peut conduire à une calcification prématurée des tissus (Golomb *et al.* 1987, Liao *et al.* 1995). D'après la littérature, ce processus pourrait être dû à une modification de structures cellulaires calcifiable riches en phosphate, au sein des tissus (Schoen & Levy 2005).

6. Calcification

6.1. Définition

Dans la littérature on peut distinguer deux types de calcifications, ectopiques et dystrophiques (Figure 21) (Giachelli 1999). La calcification ectopique fait référence à une minéralisation inappropriée des tissus mous, souvent constituée de sels phosphate de calcium dont l'hydroxyapatite. Tandis que la calcification dystrophique se produit sur les tissus mous pathologiques ou lésés. La minéralisation survenant sur des bioprothèses valvulaires peut être considérée comme dystrophique (Giachelli 1999). Ce processus fait référence au dépôt de cristaux de phosphate de calcium au sein des feuillets de la valve. Sur ces dernières, ce phénomène s'accompagne souvent d'une sténose par épaissement des feuillets ou de déchirure des feuillets entraînant une régurgitation en diastole (Schoen & Levy 2005).

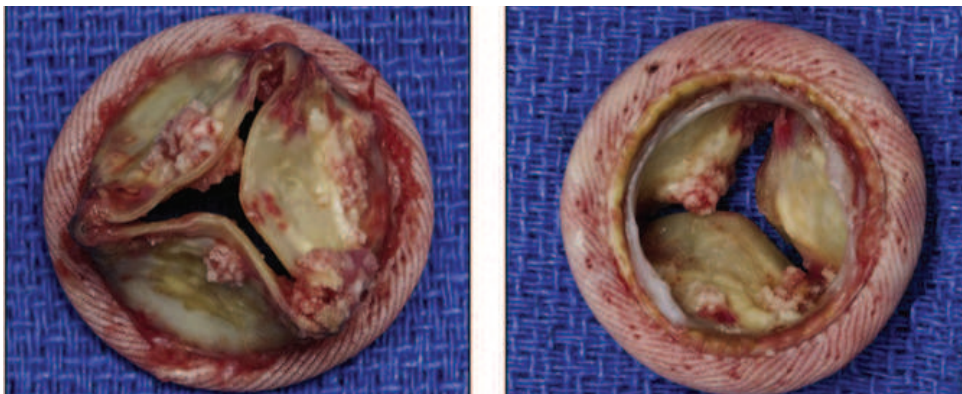


Figure 21: Bioprothèse chirurgicale explantée présentant des calcifications sur sa face aortique (droite) et ventriculaire (gauche). (Saxena et al. 2014)

6.2. Mécanisme et régulation de la calcification

La minéralisation des feuillets des bioprothèses valvulaires se produit au niveau de cellules dévitalisées qui n'ont pas été éliminées par la fixation au glutaraldéhyde (Levy *et al.* 1983, Schoen *et al.* 1986, Schoen & Levy 1999, Schoen & Levy 2005). Le mécanisme implique

l'inactivation des pompes calciques membranaires qui va conduire à une réaction entre le milieu extracellulaire riche en calcium et le phosphate contenu dans les membranes cellulaires (Schoen & Levy 2005). Les membranes cellulaires ainsi que les structures intracellulaires riches en phosphate peuvent servir de sites de nucléation et conduire à la formation de nodules de calcification (Schoen & Levy 2005).

Cette minéralisation a souvent été considérée comme un processus dégénératif, passif et non régulé. Cependant de récentes études tendent à prouver que ce mécanisme semble être régulé de façon similaire à la formation osseuse (Giachelli 1999, Speer & Giachelli 2004). Au cours de la calcification osseuse, la croissance des cristaux d'apatite est régulée par plusieurs protéines non-collagéniques contenant l'acide γ -carboxyglutamique. L'ostéopontine, une phosphoprotéine acide ayant une haute affinité pour l'hydroxyapatite ; l'ostéonectine et l'ostéocalcine, mais également la Matrix-Gla Protéine (MGP) (Schoen & Levy 2005). Certaines protéines inhibitrices jouent également un rôle dans la régulation de la minéralisation, notamment au niveau des bioprothèses valvulaires ainsi que dans l'artériosclérose (Bini *et al.* 1999, Schinke *et al.* 1999). Ces inhibiteurs comportent la protéine MGP et l'ostéopontine. L'ostéopontine permet de bloquer la croissance des cristaux d'hydroxyapatite via la production d'anhydrase carbonique II par les monocytes. Celle-ci entraîne une acidification du milieu extracellulaire permettant une dissolution des cristaux d'apatite (Sodek *et al.* 2000, Steitz *et al.* 2002). L'ostéopontine peut être exprimée dans les vaisseaux à la suite de lésions, contrairement à la protéine MGP qui est présente en grande quantité dans le cartilage et les vaisseaux (Giachelli *et al.* 1993, Shanahan *et al.* 1994, Shen *et al.* 1997). Ces différents profils d'expressions suggèrent que l'ostéopontine et MGP jouent des rôles d'inhibiteurs naturels de la calcification au niveau cardiovasculaire avec une production induite ou constitutive pour protéger les tissus d'une minéralisation ectopique. Parhami *et al.* ont pu mettre en lumière le rôle protecteur des HDL sur la calcification des

tissus vasculaires en réduisant l'activité de la phosphatase alcaline, marqueur de la différenciation ostéoblastique (Parhami *et al.* 2002). Des études ont également permis de démontrer que l'oxydation des LDL entraînait une minéralisation des tissus vasculaires par augmentation de l'activité de la phosphatase alcaline (Parhami *et al.* 1997). Les niveaux de LDL circulants ont été corrélés avec la progression des calcifications présentes sur des valves aortiques (Pohle *et al.* 2001). De plus, des LDL ont pu être extraits de valves aortiques calcifiées (O'Brien *et al.* 1996).

L'ostéopontine, la TGF- α et la ténascine-C, impliqués dans la formation de la matrice osseuse ont été mis en évidence sur des bioprothèses calcifiées explantées, suggérant leurs rôles dans cette calcification pathologique (Jian *et al.* 2001, Jian *et al.* 2003).

6.2.1. Impact du glutaraldéhyde sur la calcification

Plusieurs études ont mis en lumière l'impact du traitement au glutaraldéhyde sur la calcification des bioprothèses valvulaires (Gong *et al.* 1991, Liao *et al.* 1995, Sinha *et al.* 2012). Comme expliqué précédemment, le glutaraldéhyde a pour principale fonction de stabiliser le tissu en créant des liaisons fortes entre les différentes protéines structurelles du péricarde. Le degré de stabilisation du tissu est lié à la concentration en glutaraldéhyde appliquée, plus celle-ci est élevée plus la stabilisation sera forte (Golomb *et al.* 1987). Toutefois, l'augmentation de la stabilité du péricarde entraîne une augmentation de la calcification du tissu (Golomb *et al.* 1987, Sinha *et al.* 2012). Ces résultats suggèrent que les modifications faites par le traitement, conduisent à la stabilisation de structures cellulaires dévitalisées, et à leur calcification (Golomb *et al.* 1987). Dunn & Marmon ont émis l'hypothèse que les tissus valvulaires après préparation pouvaient encore contenir des résidus d'aldéhydes. Ces résidus seraient ensuite capable d'altérer les cellules sanguines après

implantation, celles-ci se fixeraient alors à la surface des tissus de la bioprothèse et serviraient de site de nucléation (Dunn & Marmon 1985).

6.2.2. Effet des contraintes mécaniques sur la calcification

Au cours du fonctionnement d'une bioprothèse, les feuillets subissent d'importantes contraintes mécaniques à différents régimes de pression qui peuvent conduire à une détérioration de la structure des fibres de collagène et des glycosaminoglycanes (Vyavahare *et al.* 1999, Grande-Allen *et al.* 2003, Grande-Allen *et al.* 2004). Les glycosaminoglycanes sulfatés sont liés de manière covalente à des protéines pour former des protéoglycanes. Au sein du péricarde il existe deux types de protéoglycanes dominants qui sont les dermatanes sulfatés et les chondroitines sulfatées (Simionescu *et al.* 1989). Ces protéoglycanes se situent dans des espaces inter-fibrillaires du collagène et semblent prévenir la calcification du tissu (Simionescu *et al.* 1989). Des études portant sur le collagène osseux ont pu mettre en évidence l'implication de ces espaces inter-fibrillaires dans la minéralisation osseuse (Scott & Haigh 1985, Hoshi *et al.* 1999). L'extraction sélective de certains protéoglycanes par des contraintes mécaniques ou par des protéines de dégradation de la matrice (MMP) peut aboutir à une calcification et une défaillance prématurée du tissu (Jorge-Herrero *et al.* 1991, Simionescu *et al.* 2003a, Simionescu *et al.* 2003b).

Des études portant sur des bioprothèses chirurgicales ont permis d'établir un lien entre les zones subissant les plus fortes contraintes mécaniques et le degré de calcification (Thubrikar *et al.* 1983, Thubrikar *et al.* 1986). Dans un modèle *in-vitro* de calcification utilisant une machine de durabilité dotée d'un interféromètre holographique, il a été possible d'observer des calcifications prononcées au niveau de zones fortement contraintes sur des bioprothèses chirurgicales (Deiwick *et al.* 1998). Ces observations ont été confirmées *in-vivo* par plusieurs études dont celles de Sacks & Schoen et Jorge-Herrero *et al.* Dans cette dernière, des valves

chirurgicales ont été mises en fonctionnement dans une machine de durabilité pendant 100 millions de cycles. Deux zones d'intérêts ont été prélevées, la plus fortement contrainte au niveau des commissures ainsi que la zone la moins sollicitée, au niveau de la base de la valve. Les échantillons ont été implantés en sous-dermique sur des rats Wistar jusqu'à 60 jours. Les auteurs ont pu observer que les échantillons provenant des zones contraintes étaient plus calcifiés que ceux provenant des zones faiblement contraintes. Les fortes calcifications mesurées sur les zones commissurales s'expliquent par les contraintes de flexion et compression subies par les feuillets lors de leurs fonctionnements (Thubrikar *et al.* 1983). Comme nous l'avons vu précédemment le péricarde bovin traité à la glutaraldéhyde possède une certaine résistance à la flexion. Cette résistance associée aux contraintes répétitives au niveau des commissures peut entraîner des ruptures de faisceau de collagène, qui sont susceptibles de servir de site de nucléation du calcium (Thubrikar *et al.* 1983).

6.3. Modèles d'étude de la calcification des bioprothèses

Des modèles animaux sont nécessaires afin d'évaluer le potentiel anticalcifiant des traitements appliqués sur les tissus bioprothétiques. Les animaux couramment utilisés dans ce but sont les rats Wistar et Sprague-Dawley ou des lapins New Zealand (Wright *et al.* 2009). Les petits animaux sont habituellement sélectionnés en raison de leur coût, de la rapidité de la réponse à la calcification et d'une surveillance en animalerie relativement facile (Fishbein *et al.* 1982). Les rats Sprague-Dawley sont actuellement considérés comme le gold-standard pour les études de calcification avec une période d'étude variant entre 90 jours et 6 mois (Mako *et al.* 1999, 5840-3 2013). Dans la pratique, des tissus bioprothétiques peuvent être découpés en disques pour être implantés sous la peau des rats ou des lapins.

Dans le cadre d'évaluation de sureté et d'efficacité des bioprothèses, des animaux tels que le cochon, mouton ou veau peuvent être utilisés pour un remplacement valvulaire aortique.

Toutefois le modèle de choix dans ce type d'étude reste la brebis (Trantina-Yates *et al.* 2001). La brebis est un modèle robuste qui reproduit des conditions similaires à ce que l'on observe chez l'homme en terme d'hémodynamique, de taille de l'anneau aortique et de thrombogénicité (Barnhart *et al.* 1982, Flameng *et al.* 2006). La limite de ce modèle dans l'évaluation de la calcification réside dans le nombre important de valves à implanter pour atteindre une puissance statistique suffisante, ce qui augmente significativement les coûts d'expérimentation avec ce modèle.

Lorsque l'on cherche à faire des études de calcification, l'âge des animaux est à prendre en compte. Les animaux jeunes disposent d'un métabolisme calcique très actif à cause de la croissance osseuse (Eckermann-Ross 2008, Wright *et al.* 2009). A la différence des rats, les lapins arrivent à maturité plus tardivement à 34 semaines, contre 24 pour les rats. L'implantation intramusculaire possible chez le lapin New Zealand offre des avantages pour l'étude de la calcification. Les zones intramusculaires sont en effet richement vascularisées, contrairement à la région sous dermique des rats et lapins. Cette vascularisation entraîne une réponse plus rapide de l'organisme à l'implantation d'un biomatériau que celle observée en sous dermique (Wright *et al.* 2009). De plus ces régions subissent des contraintes mécaniques qui n'existent pas en sous-dermique. Par ailleurs, d'un point de vue éthique, il est possible d'implanter un plus grand nombre d'échantillons sur le lapin que sur le rat ce qui répond aux exigences de réduction du nombre d'animaux utilisés en expérimentation.

6.4. Traitements anticalcifiants

Malgré la compréhension encore limitée des processus de calcification des bioprothèses cardiaques, de nombreuses études ont été entreprises afin d'inhiber ou réduire la minéralisation des bioprothèses valvulaires, afin d'améliorer leurs durabilités.

Plusieurs travaux ont pu démontrer l'efficacité du traitement des bioprothèses par des solutions contenant des ions trivalents. Dans un modèle d'implantation sous dermique chez le rat, des feuillets de péricarde incubés en présence d'ions Al^{3+} ont subi une calcification équivalente à 7% de celle observée chez les contrôles non incubés (Webb *et al.* 1990). Les auteurs ont également constaté une faible lixiviation d' Al^{3+} provenant des tissus traités. Dans une autre étude, les auteurs sont parvenus à démontrer que l'ion Fe^{3+} induisait une réduction de la calcification proportionnelle à sa concentration (Carpentier *et al.* 1995). L'équipe de Schoen & Levy dans une étude portant sur les ions Al^{3+}/Fe^{3+} et la phosphatase alcaline, a pu observer que l'activité maximale de la phosphatase alcaline était corrélée avec le début de la calcification des implants. Ils sont également parvenus à décrire le mécanisme d'inhibition de la calcification par les ions Al^{3+}/Fe^{3+} . Ces ions parviennent à réduire l'activité de la phosphatase alcaline par un mécanisme d'inhibition compétitive avec les ions Mg^+ et Zn^+ qui servent à son fonctionnement (Levy *et al.* 1991).

D'autres études portant sur les dérivées d'alcool ont été menées afin de déterminer le potentiel anticalcifiant de ces molécules. Des travaux ont permis de démontrer que le traitement du péricarde à une solution d'éthanol permettait d'empêcher la calcification de ce dernier (Jorge-Herrero *et al.* 1994, Vyavahare *et al.* 1997, Vyavahare *et al.* 1998, Vyavahare *et al.* 2000, Shen *et al.* 2001). Dans l'article de Jorge-Herrero *et al.*, les auteurs ont cherché à comparer l'efficacité d'un traitement à l'éthanol et à celle d'une solution de chloroforme/méthanol. L'application d'éthanol sur les feuillets entraîne une inhibition de la calcification plus efficace

que le mélange chloroforme/méthanol. L'éthanol, comme la solution chloroforme/méthanol, permet d'extraire la plupart des phospholipides et des molécules de cholestérol présents au sein des tissus, ce qui suggère l'implication de ces dernières dans les processus de calcification (Jorge-Herrero *et al.* 1994, Vyavahare *et al.* 1997). L'éthanol, contrairement au mélange chloroforme/méthanol, est capable de modifier la structure des fibres de collagène de type I, mais aussi de réduire l'activité de la phosphatase alcaline et la prolifération des cellules osseuses humaines (Friday & Howard 1991).

Des méthodes à base de détergents ont été étudiées dans la prévention de la calcification des bioprothèses valvulaires. Le traitement T6 constitué de dodécylsulfate de sodium (SDS) et d'isopropanol a entraîné une réduction significative de la minéralisation du péricarde bovin dans un modèle de calcification sous dermique chez le rat (Lentz & Pollock 1982, Lentz *et al.* 1982). Les auteurs ont suggéré que le SDS pouvait modifier la charge des fibres de collagène des tissus et ainsi empêcher sa minéralisation (Lentz *et al.* 1982, Arbustini *et al.* 1984). D'après la littérature, le SDS est également capable de bloquer la formation d'hydroxyapatite par les phospholipides acides dans des solutions métastables de phosphate de calcium (Boskey *et al.* 1979). L'équipe de Carpentier a également proposé un traitement basé sur un détergent qui est le Tween-80 (Carpentier *et al.* 1984). Dans une seconde étude, ils ont démontré qu'une application combinée avec de l'éthanol entraînait une inhibition plus importante que le Tween-80 seul (Shen *et al.* 2001). Ce qui sous-entend que l'éthanol et le Tween-80 ne ciblent pas les mêmes phospholipides et lipides au sein du tissu. Le traitement mis au point par cette équipe est la base de celui employé par la société Edwards Lifesciences, le ThermafixTM, qui y a incorporée une étape de catalyse thermique dénaturant les protéines et phospholipides pro-calcifiant (Carpentier *et al.* 1998, Carpentier *et al.* 2001, Carpentier & Carpentier 2003).

D'autres stratégies, comme le recouvrement des aldéhydes libres du tissu fixé ont été envisagées. Les travaux de Girardot sur le recouvrement font état de l'utilisation de l'acide 2-amino oléique (AOA) afin de réduire la calcification de bioprothèses aortiques porcines dans des modèles circulatoires et sous dermiques (Girardot 1990, Gott *et al.* 1992). L'AOA est un détergent capable de se fixer par son groupement 2-amino aux aldéhydes libres des tissus traités à la glutaraldéhyde (Chen *et al.* 1994). Cette molécule semble capable de réduire la diffusion de calcium au sein des cellules du tissu, mais aussi d'extraire des phospholipides membranaires (Chen *et al.* 1994). Ce traitement est notamment utilisé par la société Medtronic dans la conception de leurs bioprothèses valvulaires porcine et bovine.

Plus récemment un brevet déposé par Edwards Lifesciences fait état d'une méthode de recouvrement d'aldéhydes libres par le traitement de la valve dans une solution d'éthanolamine et de borohydrure de sodium (Dove *et al.* 2011, Shang *et al.* 2017). Cette technique aurait pour but d'empêcher la formation de groupements carboxyliques, calcifiables, par oxydation (Tod & Dove 2016). Les données présentées revendiquent une réduction de la calcification plus efficace que celles observées avec le Thermafix™. Après immersion dans un mélange de glycérol et d'éthanol, cette stratégie de recouvrement permettrait de pouvoir stocker la bioprothèse à sec sans avoir à remettre la bioprothèse dans une solution de glutaraldéhyde pour la conserver (Dove *et al.* 2011).

Malgré toutes les stratégies développées permettant de prévenir au mieux la calcification des bioprothèses, aucune méthode ne fait encore consensus. Les mécanismes de minéralisation étant multiples, ainsi que les méthodologies, il est assez difficile de pouvoir comparer les différentes méthodes entre elles. D'après la littérature, le traitement donnant les meilleurs résultats sur des bioprothèses implantées est le Thermafix™ de Edwards Lifesciences.

7. Les Déchirures de feuillets

7.1. Définitions

La dégénérescence des feuillets, pouvant se caractériser par des déchirures ou des perforations, a été largement décrite dans la littérature (Ferrans *et al.* 1987). Dans une étude menée par Ishihara, les auteurs ont considéré qu'il existait 4 types de déchirures. Les lésions de Type I faisant référence à des déchirures au niveau du bord libre des feuillets. Celles de Type II à des déchirures de la région basale du feuillet, formant un arc à proximité de la suture, Type III à de large perforation circulaire occupant la région centrale du feuillet et la Type IV à des petites perforations de la région centrale du feuillet souvent en association avec des calcifications (Figure 22) (Ishihara *et al.* 1981a, Ferrans *et al.* 1987).

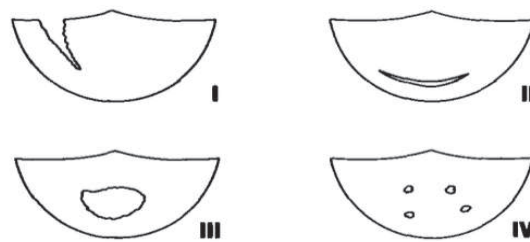


Figure 22: Différents types de lésions bioprothétiques. (Ishihara et al. 1981a)

7.2. Les Mécanismes

Au cours du fonctionnement d'une biprothèse, les feuillets d'une valve supportent plusieurs types de contraintes. Lors de la fermeture d'une valve, les feuillets sont transitoirement soumis à des contraintes de tension tandis que lors de l'ouverture, les feuillets subissent des contraintes de flexion et compression (Thubrikar *et al.* 1980, Vesely 2003). Lorsque le feuillet se plie à l'ouverture de la valve, des contraintes de compression sont générées à l'intérieur de

la zone de plicature, tandis que des contraintes de tension apparaissent sur la face externe (Figure 23).

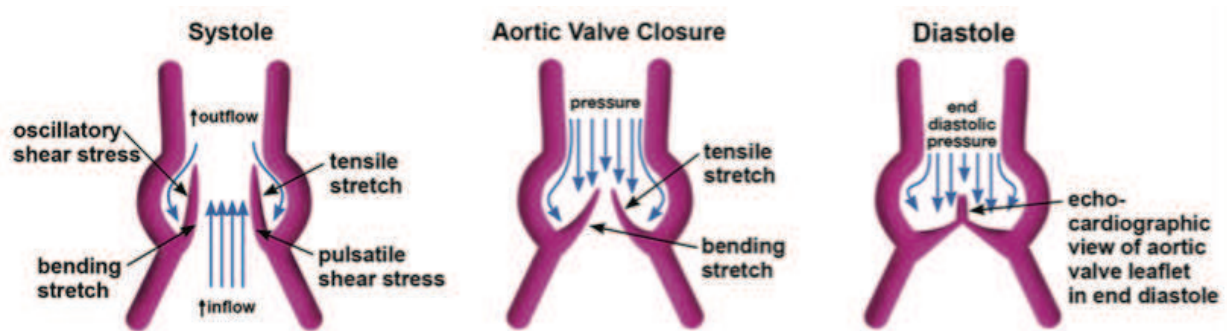


Figure 23: Flux hémodynamique à travers la valve aortique. (Rajamannan 2011)

Plusieurs études ont démontré que la plupart des déchirures étaient causées par des contraintes de flexion et de flambage subies par le tissu lors de son fonctionnement (Broom 1977, Vesely *et al.* 1988, Krucinski *et al.* 1993). L'équipe de Thubrikar a pu prouver que l'altération de l'architecture du réseau de collagène pouvait exposer des sites ayant une forte affinité pour le calcium (Thubrikar *et al.* 1983). Toutefois, que les feuillets soient calcifiés ou déchirés, les sites présentant des détériorations restent fortement associés aux zones subissant de fortes contraintes de flexion (Vesely *et al.* 1988).

Les travaux de Li & Sun utilisant la méthode des éléments finis (FEA) ont pu montrer que les zones subissant le plus de déformations lors du fonctionnement de la valve se situaient au niveau des commissures (Figure 24) (Krucinski *et al.* 1993, Li & Sun 2010).

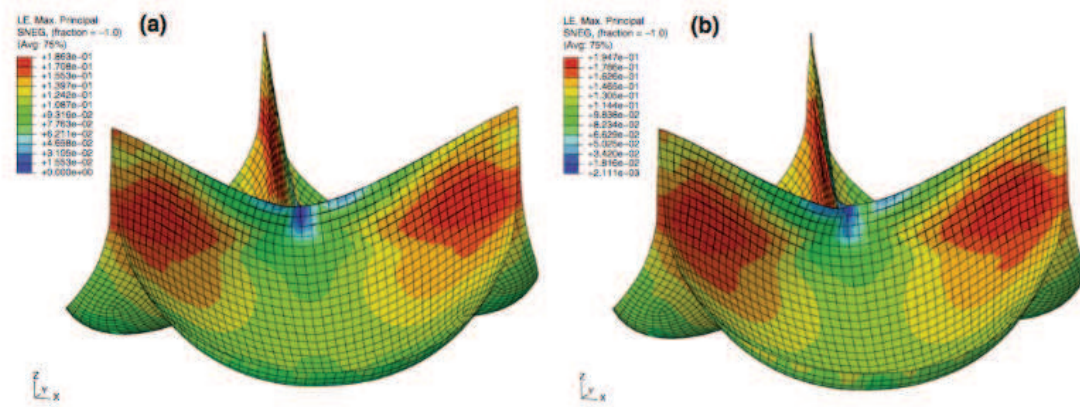


Figure 24: Simulation en FEA d'un bioprothèse valvulaire en péricarde bovin (A) et porcine (B) avec la répartition des zones de contrainte maximale. (Li & Sun 2010)

Ces résultats confirment les observations faites sur des bioprothèses explantés sur lesquels des déchirures ont été localisées dans ces régions (Ishihara *et al.* 1981a, Ferrans *et al.* 1987, Hilbert *et al.* 1992, Vesely 2003).

De nombreux travaux sur la valve Ionescu-Shiley ont pu apporter des informations supplémentaires sur les possibles causes de déchirure (Walley *et al.* 1987, Hilbert *et al.* 1992). Il apparait que les forces de frottement entre les commissures du péricarde et le revêtement en dacron ont entraîné des lésions d'abrasion sur le péricarde (Hilbert *et al.* 1992, Haziza *et al.* 1996). De plus la présence de points de sutures d'alignement ainsi que l'utilisation d'un stent rigide ont accéléré les déchirures au niveau des commissures péricarde (Hilbert *et al.* 1992, Haziza *et al.* 1996). Des études histologiques sur ces valves ont pu également mettre en lumière un épaissement du péricarde lié à une insudation de protéines plasmatiques et de lipides conduisant à une délamination du tissu (Hilbert *et al.* 1992).

Plus récemment l'équipe de Shetty a pu observer une infiltration suivie d'une oxydation de LDL au sein de bioprothèses porcine explantés chez des patients. Les auteurs ont pu mettre en évidence une activation des macrophages par les LDL-oxydés conduisant à une production de

MMP-9 (Ardans *et al.* 2002, Shetty *et al.* 2009). Les MMP-9 peuvent avoir pour substrat le collagène, l'élastine et la fibronectine participant ainsi à la dégradation du réseau de collagène, puisque des débris ont été également observés à proximité de macrophages (Tayebjee *et al.* 2005, Shetty *et al.* 2009). Ce phénomène combiné aux contraintes mécaniques subies par les feuillets semble contribuer à la formation de déchirure.

7.3. Piste d'amélioration de la durabilité des feuillets

Malgré les contraintes mécaniques subies sur les feuillets lors des cycles d'ouverture et de fermeture, des stratégies ont été mises en place afin de réduire l'occurrence de ces lésions. Des travaux menés en éléments finis (FEA) ont pu démontrer qu'il était possible d'améliorer la longévité des feuillets. Dans une étude de Martin & Sun, les auteurs ont analysé le comportement mécanique de valves ayant des feuillets avec des propriétés mécaniques différentes (Martin & Sun 2013). La valve ayant les déformations de contrainte les plus faibles au niveau des commissures possède des feuillets homogènes, avec une grande rigidité dans le sens circonférentiel et une élasticité plus prononcée dans le sens radial. Ces observations vont dans le sens des travaux de Thubrikar qui proposait que les feuillets d'une bioprothèse valvulaire aient des caractéristiques mécaniques proches des feuillets d'une valve aortique native (Thubrikar *et al.* 1980). De plus, en simulant une configuration de valve faite avec des feuillets ayant des propriétés mécaniques différentes, il apparaît une fatigue prématurée de la valve pouvant conduire à des déchirures (Martin & Sun 2013). L'équipe de Sun a également travaillé sur un modèle FEA de TAVI, dans lequel la géométrie de la valve lors de son déploiement a été simulée. Les valves présentant la forme elliptique la plus prononcée sont celles dont les feuillets se fatiguent le plus vite (Figure 25) (Sun *et al.* 2010).

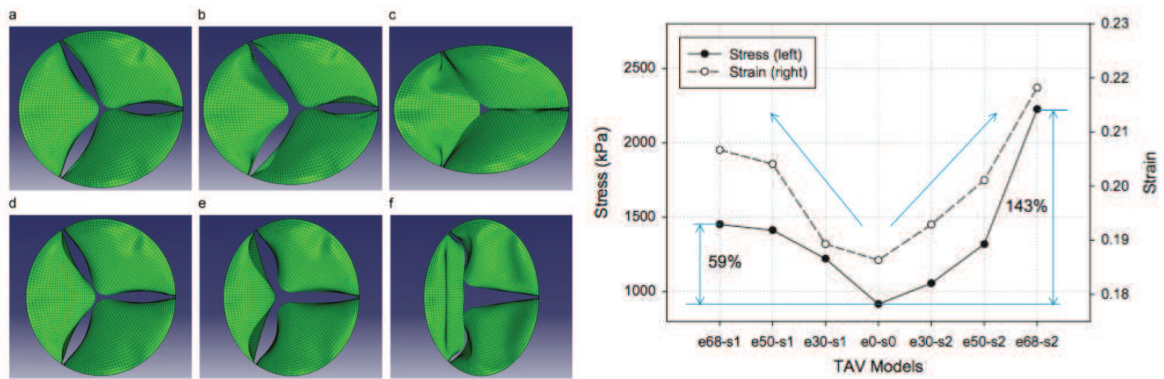


Figure 25: Simulation en FEA des contraintes et déformations subit par les feuillets de péricarde sous différentes configurations elliptiques Scénario 1 avec (A) une excentricité de 0,30, (B) de 0,50 et (C) de 0,68; Scénario 2 avec (D) une excentricité de 0,30, (E) de 0,50 et (F) de 0,68. (Sun et al. 2010)

Ces travaux soulignent l'importance d'obtenir une bonne circularité lors du déploiement d'une TAVI et ce, malgré la présence de nodule de calcification sur les feuillets aortiques natifs (Zegdi *et al.* 2012). A cet égard, les fabricants de valve ont souvent recours à des essais en machine de durabilité avec des moules d'anneaux aortiques elliptiques afin d'apprécier la fatigue des feuillets au cours du temps (5840-3 2013). Des bioprothèses testées en machine de durabilité ou explantés sur des patients ont été analysées par Zioupos. Dans son étude, les feuillets provenant des valves explantées et testées en machine de durabilité ont subi des déformations permanentes ainsi qu'une perte de leurs élasticités. Toutefois d'après leur estimation, les valves devraient avoir une durée de vie supérieure à 10 ans même si la qualité des feuillets diminue au cours du temps (Zioupos *et al.* 1993).

Le design du stent peut également jouer un rôle dans la création de déchirure sur les feuillets de la bioprothèse. Krucinski a mis en évidence sur un modèle en FEA l'influence de la rigidité du stent sur les contraintes subies par les feuillets. Lorsque des feuillets sont montés sur un stent rigide, comme ce fût le cas pour la Ionescu-Shiley, les feuillets subissent de fortes

contraintes qui peuvent conduire à des déchirures au niveau des commissures (Schoen *et al.* 1987, Hilbert *et al.* 1992, Krucinski *et al.* 1993). L'utilisation d'un stent plus souple par les auteurs a permis de réduire le niveau de contrainte subi par les feuillets sur les commissures (Martin & Sun 2013).

8. Lésions induites par le sertissage et déploiement des bioprothèses percutanées

8.1. Conséquences sur la structure et la mécanique du péricarde

De récentes études sur des bioprothèses SAPIEN implantées chez des patients ont mis en évidence que le sertissage et déploiement de la valve pouvait entraîner une altération de l'architecture fibrillaire du péricarde (Zegdi *et al.* 2011). Dans ces travaux, les auteurs ont observé une altération des fibres de collagène plus importante que sur des valves non serties. De plus, sur une de ces valves ont été détectées des zones d'insudation plasmatiques (Figure 26).

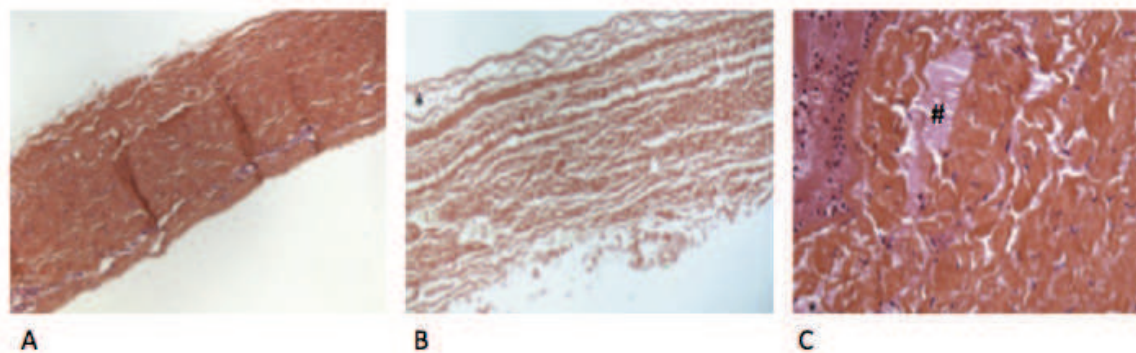


Figure 26: Sections histologiques de péricarde bovin provenant de valve SAPIEN non crimpés (A) et crimpés (B) et (C). (Zegdi *et al.* 2011)

Ces résultats ont été confirmés par l'équipe de De Buhr sur une étude portant sur des bioprothèses « artisanales », au niveau lesquelles des altérations macroscopiques et microscopiques du péricarde ont pu être observées (Figure 27) (de Buhr *et al.* 2012).



Figure 27: Photographie de péricarde crimpés (A) et non crimpés (B). (de Buhr *et al.* 2012)

La sévérité des lésions est autant plus susceptible de varier en fonction du type de stent qui est utilisé pour faire la bioprothèse. Dans des travaux menés par l'équipe de Zegdi, les auteurs ont rapporté des lésions de rupture plus fréquentes avec un stent déployé par ballonnet qu'avec un stent auto-expansible. Suggérant l'impact de l'inflation du ballonnet sur le péricarde contre les parois du stent lors du déploiement de la valve (Amahzoune *et al.* 2013).

L'influence du diamètre de sertissage a également été étudiée sur des bioprothèses auto-expansibles, afin de savoir si celui-ci avait un effet sur l'altération des fibres de collagène. Des analyses en microscopie électronique ont pu établir des lésions à la surface du péricarde pour tous les diamètres étudiés, 14F, 16F et 18F, (Figure 28). Cependant, l'analyse des couches profondes du tissu par SHG (Second-Harmonic Generation microscopy) a révélé que la compression à 14F entraînait plus de lésions dans ces zones. Les auteurs ont également observé que les lésions n'évoluaient pas dans le temps après la compression (Alavi *et al.* 2014).

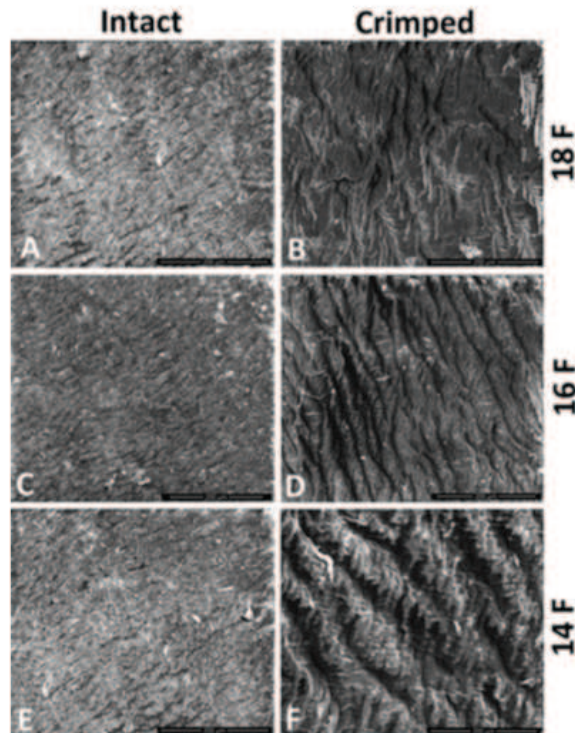


Figure 28: Images en microscopie électronique à balayage de péricarde bovin non crimpés (A), (C), (E) et crimpés (B), (D), (F) à différents diamètres (Alavi et al. 2014).

En plus d'altérer le réseau de collagène, le sertissage des valves est susceptible d'entraîner des modifications des propriétés mécaniques du péricarde. L'équipe de Bianchi par la méthode des éléments finis a développé un modèle de valve SAPIEN à l'état comprimé et déployé. Il en ressort que le péricarde subit le plus de contraintes au niveau des commissures et très peu sur la région du ventre qui n'est pas autant sollicité en plicature que les commissures. Ces travaux vont dans le sens de ceux fait par Khoffi & Heim, puisqu'ils ont pu observer sur des valves de 21-mm comprimées à un diamètre de 10F, une réduction de 50% de la contrainte maximale à la rupture du péricarde (Khoffi & Heim 2015).

Une étude menée par l'équipe de Munnelly a mis en évidence une augmentation du module de Young et donc une rigidification du péricarde bovin après crimping (Munnelly *et al.* 2012). Cependant ces observations sont à prendre avec des pincettes puisque la méthode de

sertissage utilisée ne correspond pas à ce qui est fait en pratique clinique. Des patches de péricarde bovin ont été pliés deux fois avant d'être comprimés à 35N pendant 30min entre plaques parallèles.

L'intérêt du crimping à 10F dans la première étude était de déterminer la faisabilité d'une réduction de la taille du cathéter sans incidence sur le fonctionnement de la bioprothèse. Mais il semble important de prendre en compte l'encombrement total au sein du stent serti. En comprimant à un diamètre très faible, le manque d'espace disponible peut conduire à un sur-écrasement du péricarde contre les parois du stent. Ce qui semble expliquer les différences observées en traction sur les péricardes issus des valves de 21 et 19mm. Il pourrait être possible de faire varier l'épaisseur du péricarde, mais il s'avère qu'en réduisant son épaisseur, on tend à augmenter les contraintes subies par les feuillets lors de leurs fonctionnements (Figure 29) (Li & Sun 2010).

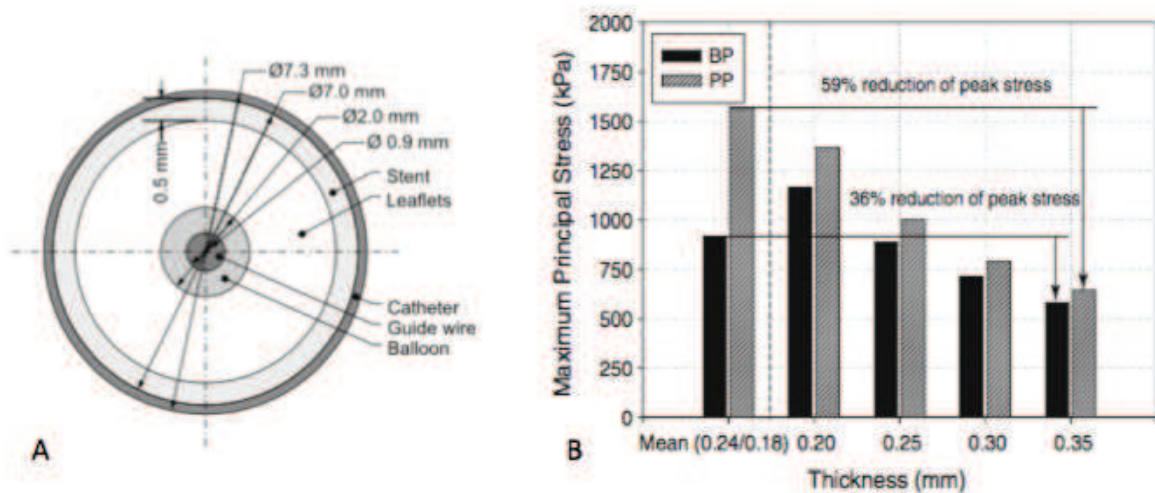


Figure 29: A) Coupe d'une capsule de TAVI ; B) Simulation des contraintes subies par les feuillets en fonction de leurs épaisseurs. BP : Bovine Pericardium, PP : Porcine Pericardium.

(Li & Sun 2010).

8.2. Conséquences biologiques du sertissage

8.2.1. Calcification

A ce jour, il existe seulement deux études portant sur la calcification des bioprothèses valvulaires percutanées après crimping et déploiement. La première étude a été menée par l'équipe de Kiefer sur des valves SAPIEN (déployés par ballonnet) dont les feuillets ont été implantés en sous-dermique sur des rats Wistar pendant 12 semaines. Dans un premier temps les auteurs confirment les altérations structurelles subies par le péricarde au cours du crimping. Cependant leur étude de calcification fait état d'aucune minéralisation prématurée des feuillets ayant été crimpés (Kiefer *et al.* 2011). Ces observations sont en opposition avec les travaux discutés précédemment faisant le lien entre l'altération des fibres de collagène et la calcification prématurée de bioprothèses chirurgicales.

Toutefois la seconde étude réalisée par l'équipe de Kheradvar sur des valves auto-expansibles semble prouver le contraire. Les auteurs ont crimpé des valves à un diamètre de 14F pour ensuite incuber leurs feuillets dans un milieu calcifiant (*in-vitro*) pendant 7 semaines. Dans ces travaux, ils observent également une altération des fibres de collagène du péricarde après crimping. L'étude histologique des feuillets incubés et non incubés révèle la présence de dépôt d'hydroxyapatite au niveau des zones ayant été comprimées par le stent lors du sertissage (Sinha & Kheradvar 2015).

8.2.2. Thrombogénicité

Plusieurs équipes ont récemment mis en évidence chez certains patients des cas de thrombose de bioprothèses percutanées (De Marchena *et al.* 2015). Dans le cadre d'une étude clinique portant sur les bioprothèses, les auteurs ont pu observer la présence formation de thrombus quelques soit le type de bioprothèses (percutanées ou chirurgicales). Malgré la mobilité

réduite du feuillet porteur de la thrombose, ce phénomène se traduit par des symptômes clinique dans 1% des cas. (Makkar *et al.* 2015).

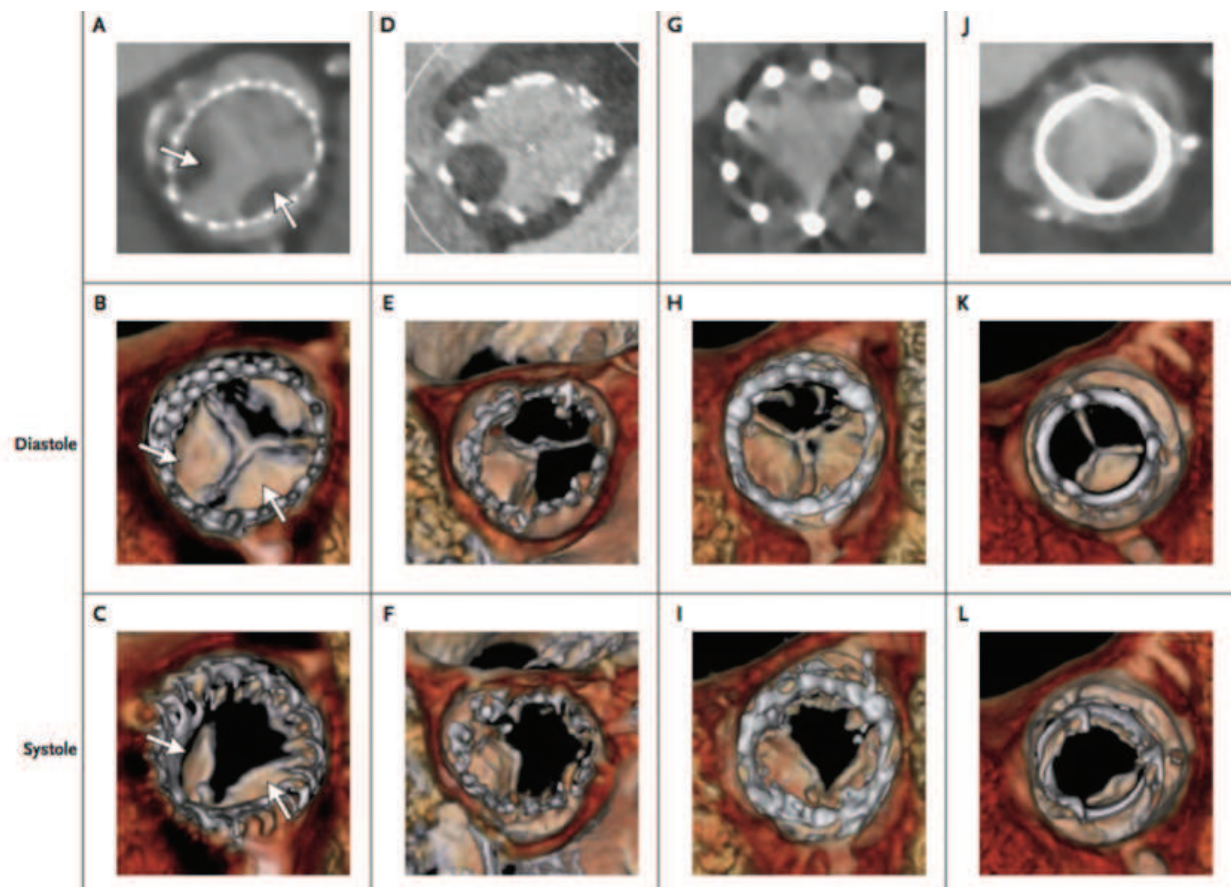


Figure 30: Scanner de différents types de bioprothèses porteuses de thromboses. (A-C) CoreValve ; (D-F) Portico; (G-I) SAPIEN-XT ; (J-L) Carpentier-Edwards. (Makkar *et al.* 2015)

Les raisons de cette formation de thrombus sur les bioprothèses semblent être d'origine immunitaires puisque chez les patients pour lesquels un traitement à la warfarine à été proposé, l'incidence de thrombose était la plus faible. De plus l'influence du sertissage sur la thrombose peut être écarté puisque ce phénomène à été observé sur les prothèses chirurgicale et percutanées sans différences notable entre ces deux types.

Dans un modèle d'étude *in-vitro* de thrombose, des auteurs ont récemment mis en évidence que le sertissage et déploiement par ballonnet pouvait augmenter l'accumulation de plaquettes sur la face fibreuse des feuillets de péricarde (Bourget *et al.* 2016). Ce phénomène semblerait être due à des modifications de surface induite par le processus de sertissage et déploiement (Bourget *et al.* 2016).

8.3. Données cliniques sur les détériorations bioprothétiques

Plusieurs études à moyen terme (5 ans) ont été publiées sur les deux bioprothèses percutanées disponibles sur le marché, la SAPIEN et la CoreValve. D'après l'étude PARTNER-1, les SAPIEN présentent aucune détérioration structurelle à 5 ans post-implantation (Kapadia *et al.* 2015, Mack *et al.* 2015). Cependant une autre étude à 5 ans portant sur un nombre de patients beaucoup plus réduit (n=88), revendique un taux de dégénérescence valvulaire de 3.4% du groupe initial (Toggweiler *et al.* 2013). Dans le cas des CoreValve, le taux de détérioration structurelle à 5 ans est de 1.4% des 353 patients de l'étude (Barbanti *et al.* 2015).

D'après ces travaux, le TAVI donne de bons résultats en termes de durabilité des prothèses à moyen terme (Tableau 1). Ce constat est renforcé par les récentes données sur des patients à risque intermédiaire, à 2 ans post-implantation, pour lesquels les auteurs n'observent aucune dégradation de prothèses (Leon *et al.* 2016). Plus récemment des travaux de Dvir *et al* ont rapporté une incidence d'environ 18% de détérioration structurelle de bioprothèses à 6ans (Dvir *et al.* 2016). Toutefois ces données sont largement débattues par la communauté scientifique puisque la définition de détérioration structurelle ne fait pas consensus (Figure 31) (Capodanno *et al.* 2017).

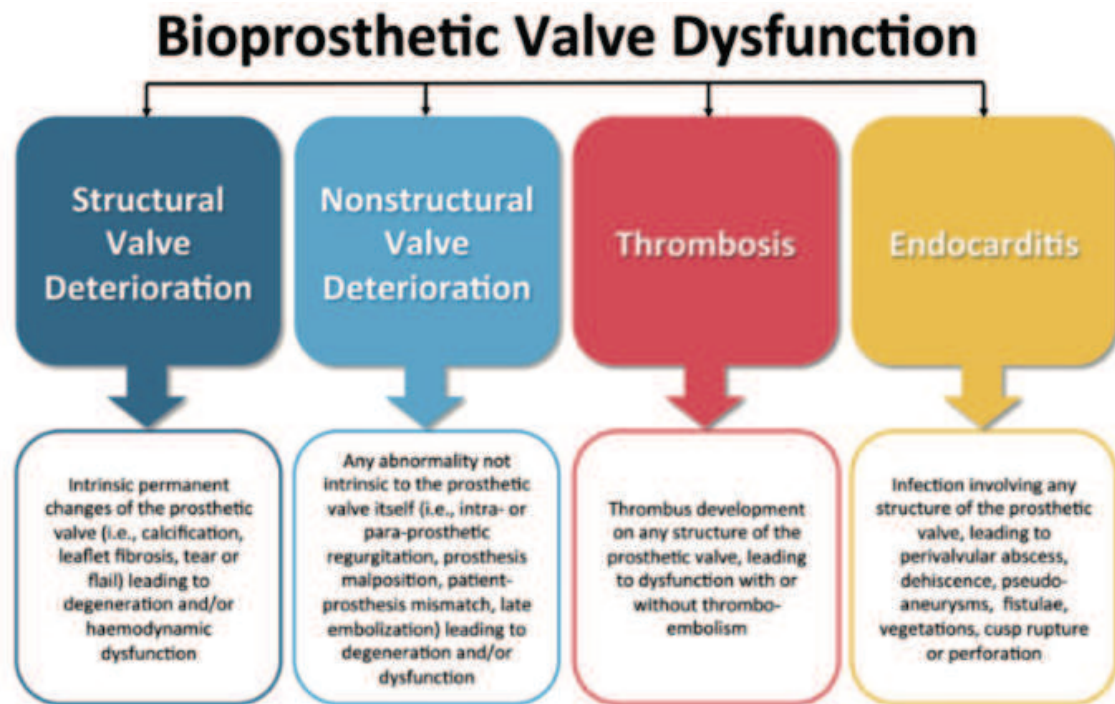


Figure 31: Causes de détérioration structurelle des bioprothèses (Capodanno *et al.* 2017).

En dépit de ces bons résultats à 5ans, il est rapporté dans la littérature plusieurs cas de détérioration de bioprothèses percutanées SAPIEN ou CoreValve (Tableau 2) (Figure 32). En raison du manque de données à long terme concernant la durabilité de ces dispositifs, il est à ce jour difficile d'affirmer avec certitude que le sertissage des bioprothèses percutanées réduit leur durabilité en accélérant l'occurrence de détérioration structurelle de la bioprothèse.

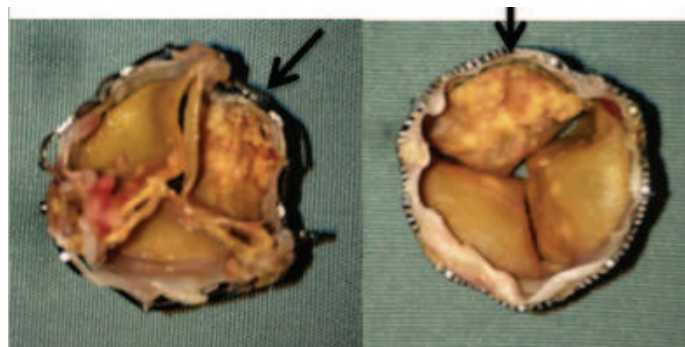


Figure 32: Valve SAPIEN présentant des calcifications massives sur un feuillet (Dvir *et al.* 2016).

Valve	Nombre	Follow-up (années)	ETT (en fin de protocole)	SVD (%)	Auteurs
Edwards SAPIEN	88	5	84	3.4% (3 cas)	(Toggweiler <i>et al.</i> 2013)
Edwards SAPIEN	348	5	100	0	(Mack <i>et al.</i> 2015)
Edwards SAPIEN	378	Jusqu'à 6	378	18% (68 cas)	(Dvir <i>et al.</i> 2016)
Edwards SAPIEN	738		129		
CoreValve	756	Jusqu'à 5		4.5% (68 cas)	(Del Trigo <i>et al.</i> 2016)
Edwards SAPIEN	318	Jusqu'à 5	96	30% (96 cas)	(Muratori <i>et al.</i> 2017)
CoreValve	353	Jusqu'à 5	194	1.4% (5 cas)	(Barbanti <i>et al.</i> 2015)
CoreValve	125	Jusqu'à 4	83	3.2% (4 cas)	(Gulino <i>et al.</i> 2016)

Tableau 1: Occurrence des détériorations structurelles sur les bioprothèses percutanées dans des études avec un suivi ≥ 5 ans. ETT : Echocardiographie Trans-Thoracique ; SVD : Structural Valve Deterioration.

Type de prothèses	Signe Clinique (Mode de défaillance)	Age d'implantation	Délai (années)	Auteurs
Edwards SAPIEN	Régurgitation aortique (Thrombose)	88	4	(Summers <i>et al.</i> 2017)
Edwards SAPIEN	Régurgitation aortique (Déchirure)	92	3	(Summers <i>et al.</i> 2017)
Edwards SAPIEN	Resténose aortique Calcification	50	3	(van Steenberghe <i>et al.</i> 2016)
Edwards SAPIEN	Resténose aortique (Calcification)	62	2	(Harbaoui <i>et al.</i> 2016)
CoreValve	Resténose aortique Fibrose/Calcification	44	4	(Deutsch <i>et al.</i> 2015)
CoreValve	Régurgitation aortique (Prolapse d'un feuillet)	74	3	(Sinning <i>et al.</i> 2014)
CoreValve	Resténose aortique (Calcification)	69	5	(Ong <i>et al.</i> 2012)
CoreValve	Resténose aortique (Thrombose)	68	5	(Richardt <i>et al.</i> 2015)
CoreValve	Régurgitation aortique (Déchirure feuillet)	79	1	(Richardt <i>et al.</i> 2015)
CoreValve	Resténose aortique Calcification	60	3	(Bothner <i>et al.</i> 2017)

Tableau 2: Case reports de détérioration structurelle de bioprothèses percutanées

OBJECTIF DE L'ÉTUDE

De récentes études ont permis de mettre en évidence le rôle du sertissage dans l'altération de la structure du péricarde. En effet, lors du sertissage de la bioprothèse, le péricarde se retrouve contraint dans un espace réduit (14-16F) avant d'être implanté. Les lésions rapportées dans la littérature sont principalement des ruptures et dissociations des faisceaux de collagène.

Des travaux effectués par notre équipe ont pu démontrer l'existence de lésions dans l'architecture du péricarde, ainsi que des zones d'insudation plasmatique sur une bioprothèse explantée seulement quelques heures après sa pose. Il a également été observé par l'intermédiaire d'une chambre de pression, que le sertissage et déploiement par ballonnet des valves percutanées entraînait une augmentation de la perméabilité hydraulique du péricarde.

Cependant, la majorité de ces travaux reposent sur des analyses histologiques en microscopie optique ou électronique. Très peu d'études ont évalué les conséquences du sertissage sur le comportement mécanique du péricarde ou sur sa calcification *in-vitro*. Les études consacrées à l'évaluation des conséquences du sertissage ont analysé de différentes façons ce traumatisme. Une évaluation histologique a été régulièrement utilisée. Seules deux études ont permis d'analyser le comportement mécanique après crimping (Munnelly *et al.* 2012, Khoffi & Heim 2015). Ces méthodes ont de nombreuses limites. Les lésions induites par le traumatisme sont souvent complexes et ont une distribution hétérogène, ce qui a pour conséquence une difficulté dans leurs quantifications. Pour les méthodes mécaniques seules des études uniaxiales ont été faites. Or le péricarde est anisotrope, une étude complète des propriétés mécaniques aurait dû nécessiter une étude multi-plan. Mais compte tenu du caractère hétérogène de la distribution des lésions, seule une étude des variations locales des propriétés mécaniques (par indentation) permettrait d'évaluer les conséquences mécaniques du sertissage.

Nous avons mis au point un modèle d'évaluation du péricarde en assimilant ce tissu à une membrane nous permettant ainsi de déterminer sa perméabilité hydraulique (Convelbo *et al.* 2013). Cependant bien que ce test soit quantitatif, il ne permet pas d'évaluer les variations locales de la perméabilité qui aurait pu être hétérogène comme le suggèrent les études histologiques.

L'objectif principal de cette thèse était donc de développer de nouveaux outils d'analyse du traumatisme valvulaire des bioprothèses percutanées. L'objectif secondaire était d'évaluer l'impact du sertissage sur les propriétés mécaniques et la calcification de différents types de péricarde. Pour cela, les travaux ont été divisés en plusieurs volets.

Le premier volet de cette thèse (Etude 1) visait à étudier les différences de perméabilité (hydraulique ou plasmatique) entre le péricarde bovin et porcine. Par ailleurs dans le prolongement d'un travail antérieur, nous avons cherché à évaluer les différences locales de perméabilité hydraulique. De précédentes études ont démontré que le péricarde porcine était plus fin que le péricarde bovin. Toutefois, en ce qui concerne les propriétés mécaniques de ces tissus, les conclusions des rares études existantes sont discordantes et semblent dépendre de la méthode d'évaluation. A la suite de nos précédents travaux sur la perméabilité hydraulique, il nous a paru intéressant de comparer ces deux matériaux, afin de déterminer s'ils se comportaient de la même manière face au passage de différents solutés.

Les deux prothèses les plus utilisées en pratique clinique pour traiter les patients sont la SAPIEN et CoreValve. La première est constituée de d'un stent déployé par un ballonnet avec des feuillets en péricarde bovin. La seconde est constituée d'un stent auto-expansible avec des feuillets en péricarde porcine. Aucun travail expérimental n'a comparé le risque de traumatisme péricardique lié au sertissage de ces deux types de bioprothèses. Le second volet

de cette thèse (Etude 2) visait donc à comparer, à l'aide des outils mis en place dans la première étude, les conséquences tissulaires du sertissage des valves déployées par ballonnet (avec péricarde bovin) et des valves auto-expansible (avec péricarde porcine). Ces travaux viennent en complément de ceux portant sur les valves déployées par ballonnet, dans lesquels il a été mis en évidence une augmentation de la perméabilité hydraulique après déploiement.

Seule une étude dont la méthodologie était contestable a évalué l'impact du sertissage sur la calcification des prothèses SAPIEN. Il n'existe pas d'étude portant sur la calcification des bioprothèses auto-expansibles faites de péricarde porcine. Le dernier volet de ces travaux (Etude 3) était donc de déterminer si le sertissage des valves auto-expansibles avec péricarde porcine était responsable d'une calcification accélérée *in-vivo* des feuillets des prothèses serties. Par ailleurs une étude sur les conséquences mécaniques du sertissage sur les propriétés mécaniques du péricarde porcine des prothèses auto-expansibles a été effectuée.

ETUDE 1

INTRODUCTION

Le remplacement valvulaire par voie percutanée a été introduit en clinique par le Pr Alain Cribier en 2002 dans le cadre du traitement de la sténose aortique sévère chez des patients ne pouvant avoir recours à la chirurgie.

Les péricardes bovins et porcins sont majoritairement utilisés dans la conception des bioprothèses percutanées. Ces tissus sont constitués en grande partie de collagène, environ 90% et 40% pour le bovin et porcine, respectivement.

De récents travaux ont pu mettre en évidence que le sertissage et déploiement des valves percutanées pouvait entraîner une altération de la structure des feuillets de péricarde. Dans nos précédents travaux, nous avons pu mettre en évidence via l'utilisation d'une chambre de pression que la perméabilité du péricarde était augmentée après sertissage et déploiement d'une bioprothèse par ballonnet. Nous avons également pu observer des zones d'insudation plasmatiques sur une valve explantée seulement quelques heures après leurs poses.

Toutefois, d'après les récentes données de la littérature, les détériorations précoces de ces bioprothèses sont très rares. Mais il est important de noter que la durabilité à long-terme de ces dispositifs demeure inconnue.

Le but de cette étude était avant tout de comparer les perméabilités hydrauliques et plasmatiques entre le péricarde bovin et porcine. Par ailleurs, un nouvel outil d'évaluation de la perméabilité hydraulique locale a été mis au point.

Les résultats de la présente étude ont montré une perméabilité hydraulique 5-fois supérieure pour le péricarde porcine comparativement au péricarde bovin. Nous avons également constaté d'importantes variations locales dans la perméabilité du péricarde porcine. Enfin, nous avons aussi noté une absence d'insudation plasmatique pour le péricarde bovin contrairement au péricarde porcine qui présentait une forte insudation plasmatique.

Comparison of tissular permeabilty
between porcine and bovine pericardium.

Comparison of tissular permeabilty between porcine and bovine pericardium.

Channing Convelbo, PhD^b ; Hanane El-Hafci, BSc^b; Rachid Zegdi, MD, PhD^{a,c}

Affiliations:

- 1) Université Paris Descartes, Paris V, France (a)
- 2) CNRS UMR 7052 Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) - Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris (b)
- 3) AP-HP, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, France ; Service de Chirurgie Cardio-vasculaire (c), service de cardiologie (d)

Corresponding author : Channing Convelbo

Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) ; 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris.

E-mail address: c.convelbo@gmail.com

Telephone: +33(0)1 57 27 85 70

Fax: +33(0)1 57 27 85 71

Key words: Porcine pericardium; bovine pericardium; hydraulic conductance; Evans blue dye; Plasma insudation.

ABSTRACT

Background and aim of the study

Comparison of tissular permeability between porcine and bovine pericardium has not been reported so far. The main goal of the present study was to compare the hydraulic and plasmatic conductance of both pericardiums.

Materials and methods

Squared patches (25 x 25mm) of bovine and porcine pericardium were mounted within a pressure chamber filled either with Evans Blue dye solution or bovine plasma. Global hydraulic conductance was determined with Evans Blue dye solution. Local hydraulic conductance was evaluated in two distinct areas within each patch of pericardium. Tissular plasma insudation was assessed on histology.

Results

The global hydraulic conductance was 5-times higher for porcine pericardium compared to bovine pericardium (179.2 ± 37.0 ml/h/m²/mmHg vs. 11.3 ± 4.6 ml/h/m²/mmHg; $p= 0.001$). Significant regional differences in hydraulic conductances were only found within porcine pericardium. Plasmatic insudation was observed in 92.8% of studied fields from porcine pericardium. Conversely, there was no plasmatic insudation within bovine pericardium.

Conclusions

Porcine pericardium has a significantly higher global and local permeability to Evans Blue dye solution than bovine pericardium. Tissue plasmatic insudation was only seen in porcine pericardium.

INTRODUCTION

Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) has been introduced into clinical practice in 2002 to treat high-risk surgical patients with severe aortic valve stenosis (1, 2). TAVI is increasingly being used. In Germany, for example, more than half of the patients with severe aortic valve stenosis are now treated by TAVI (3).

Bovine and porcine pericardiums are the two most frequently used substitutes in the manufacturing of the transcatheter prostheses. A few studies have suggested that early deterioration is infrequent (4, 5). However, their long-term risk of prostheses failure is unknown.

Several studies have shown that pericardial leaflets could be damaged during prostheses crimping and deployment (6, 7). In a previous work, our group has shown that leaflet hydraulic conductance could be used as a marker of leaflet injury (8). Our study, however, was done with bovine pericardium, only. We have also reported a case of TAVI with early (within 3 hours) plasmatic leaflet insudation a phenomenon usually described in late prosthesis deterioration (6), (9).

The main goal of the current study was, therefore, to compare the hydraulic conductance of both types of pericardium, either globally or locally, with modification of our previously reported method (8). The tissular permeability to bovine plasma was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Pericardial samples:

Samples of bovine and porcine pericardium were purchased from a manufacturer (Neovasc, British Columbia, Canada). The samples were delivered in a 0.625% glutaraldehyde solution.

Sheets were cut into square (25×25mm) patches. The rough (or fibrous) and smooth (or serous) faces of the pericardial tissue were visually distinguished.

Before each experiment, tissue thickness was measured with a micrometer (Mitutoyo, Takatsu-ku, Japan) working between 0.01 and 10 mm. The thickness was measured at the center of each pericardial patch. Values were taken after a stabilization period of 5 s. All porcine leaflets had a thickness ranging from 0.12 to 0.25mm while bovine pericardial leaflets from 0.32 to 0.38mm

Pressure chamber:

Determination of the hydraulic conductance of pericardial patches with a pressure chamber has been previously described (8). Briefly, the pressure chamber consisted in a cylindrical tube filled with a fluid. Pericardial patches were placed between two ‘pistons’ with the smooth (serous) surface always directed toward the fluids. The superior and inferior ‘pistons’ had a central coaxial orifice of 21.5-mm diameter. The chamber was connected by a three-way cock valve to a rotating syringe filled with the same fluid as in the pressure chamber. The three-way cock valve was also connected to a mercurial manometer to measure the pressure within the chamber. A container was placed on a weighting scale positioned under the pressure chamber. The amount of collected fluids was measured and used for the calculation of the tissue hydraulic conductance (Kf). To calculate the hydraulic conductance of the

pericardial patches, the density of fluids that were used was assumed to be $\rho = 1.00 \text{ g/ml}$. The hydraulic conductance formula was $K_f = m/\rho \cdot t \cdot S \cdot P$, where m (g) corresponded to the mass of the collected fluid within a given time period, t (h) the time period during which the solution was collected, S (m²) the surface of the pericardium directly in contact with the fluid and P (mmHg) the pressure within the chamber. All measurements were performed at ambient temperature.

The pressure chamber was also used to induce plasmatic insudation in pericardial patches. The chamber was filled with a bovine plasma solution (Biowest, Riverside, USA). The patches were exposed to plasma during 20min at a pressure of 75 mmHg. This pressure was close to that sustained by valve leaflets after their closure. The time of exposure was based on preliminary studies (data not shown).

Methods

EB dye global and local hydraulic conductance:

The “global” hydraulic conductance was first determined with a pressure within the chamber set at 250mmHg during 20min for bovine pericardium and at 100mmHg during 10min for porcine pericardium.

The “local” hydraulic conductance was determined using a plastic disc positioned between the pericardial membrane on one side and the piston on the other side. Within the disc, close to its border, was an 8-mm diameter orifice (Figure 1). Once the pressure was applied within the chamber, filtration could only occur through the pericardium area facing the disc orifice. Filtration was determined in two areas that differed from their coloring seen after

determination of the global EB dye hydraulic conductance. Within a patch, the most and less colored areas were selected on visual inspection. This selection was much easier in case of porcine pericardium (Figure 1). The “local” Kf was performed under the same experimental setting used for the determination of the “global” Kf.

Digital Image Analysis:

The dye fixation to a tissue is usually not homogeneous and may be quantified by digital image analysis. In the current study, it was hypothesized that the pixel intensity (obtained during image digitalization) reflected the “local” tissular dye content.

After “global” or “local” exposure of to the EB dye solution, the serous surface of each patch was digitalized using a digital camera Nikon D40 (Nikon, Shinjuku, Japan). The area of each patch exposed to the EB dye solution was split into Red, Green and Blue channels with ImageJ software package (NIH, Maryland, USA). This command divides the Red, Green, and Blue channels of a RGB image into independent grayscale documents that can be saved as separate files. The green channel, which provided the best contrast, was chosen for the analysis. The resulting image was made of pixels characterized by their intensity in shade of gray ranging from 0 (black) to 255 (white). Using ImageJ it was possible for each patch, to analyze the distribution of pixels relatively to their intensity. The heterogeneity of EB dye staining was assessed using the standard deviation (SD) of the pixels intensity.

Histology:

After storage in 10% phosphate-buffered formalin, the pericardial patches were dehydrated and then embedded in paraffin. The paraffin-embedded tissue was cut into 7- μ m thick slices using a rotatory microtome Leica RM2135 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany)

and stained with Masson's trichome. The samples were analyzed and digitalized pictures were obtained at x20 magnification. For each leaflet, three randomly chosen sections were analyzed.

The main purpose of the histological analysis was to determine the occurrence of plasmatic insudation within the leaflets. Fibrin deposits were almost always observed on the smooth surface of the pericardial patches. Areas of plasmatic tissular infiltration were, therefore, easily identifiable, especially in locations close to the serous surface. For each studied group, occurrence of plasmatic tissular insudation (i.e., presence of areas of plasmatic infiltration) was expressed as percentage.

Experimental protocol

Experiment 1: Global hydraulic conductance to EB dye solution

In this experiment the chamber pressure was filled with EB dye. Both types of pericardium were evaluated (n=5/group). The purpose of the study was to determine the impact of the pressure within the chamber on the hydraulic conductance for each type of pericardium. Each pericardial patch was exposed to incremental pressure levels. Pressure within the chamber was first set at 50 mmHg and then increased by 50 mmHg every 10 min. The amount of fluids collected before each increase in pressure was used to calculate the Kf.

Experiment 2: Global and local hydraulic conductance to EB dye solution

The goal of this experiment was to evaluate the uniformity of the hydraulic conductance across the patch surface.

First, the “global” hydraulic conductance of bovine (n=10) and porcine (n=5) pericardium was evaluated using an EB dye solution within the pressure chamber. Then, in each patch the “local” hydraulic conductance was determined using Evans Blue dye solution in two areas differing by their EB dye staining.

Experiment 3: Bovine plasma filtration

The aim of this experiment was to determine whether or not plasmatic insudation occurred after exposure of pericardial patches to bovine plasma. Bovine (n=5) and porcine (n=5) patches underwent plasma filtration within the pressure chamber. At the end of the experiment, the patches were removed and their surface gently rinsed with saline. Then, the patches were processed for histological examination.

Statistical analysis

Quantitative variables were expressed as mean \pm standard error of the mean. Comparisons between variables were performed using parametric paired or unpaired Student t-test or non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests when appropriate. Correlation between two continuous variables was evaluated with the Pearson’s rank-order correlation coefficient. Statistical significance was defined as a p-value <0.05 .

RESULTS

Experiment 1: Hydraulic conductance to EB dye solution

At each pressure level (50 to 150 mmHg), porcine hydraulic conductance was significantly higher than bovine (Figure 2).

There was no significant correlation between the hydraulic conductance and the pressure within the chamber for porcine ($p=0.716$) and bovine pericardium ($p=0.122$), respectively.

Experiment 2: Global and local hydraulic conductance to EB dye solution

The global EB dye hydraulic conductance was significantly higher for porcine pericardium compared with bovine pericardium (179.2 ± 37.0 ml/h/m²/mmHg vs. 11.3 ± 4.6 ml/h/m²/mmHg; $p= 0.001$).

After exposure to EB dye, the macroscopic examination of patches revealed that the serous surface of bovine pericardium had a more or less uniform coloration. This was not the case with porcine pericardium where marked and poorly stained areas coexisted in each patch (Figure 3).

The standard deviation of pixels distribution was significantly higher with porcine pericardium compared with bovine pericardium: (16.8 ± 1.1 vs. 8.6 ± 1.5 ; $p=0.008$). A typical distribution of the intensity of pixels for a porcine and a bovine pericardial patch is reported on Figure 4.

In porcine pericardium, the local hydraulic conductance was significantly higher in the most stained areas in comparison to the less stained ones: (236.3 ± 44.0 ml/h/m²/mmHg vs. 130.8 ± 29.9 ml/h/m²/mmHg; $p= 0.03$). For bovine pericardium, however, this difference did not

reach statistical significance (4.7 ± 2.4 ml/h/m²/mmHg vs. 0.0 ± 0.0 ml/h/m²/mmHg; p= 0.08).

For porcine pericardium there was a significant correlation between the local hydraulic conductance and the mean of pixels intensity of the same selected areas (p= 0.001) (Figure 5).

For bovine pericardium the two parameters were not correlated (p= 0.172).

Experiment 3: Bovine plasma filtration

On histological analysis, areas of plasmatic insudation were easily detected. These areas of varying extension were predominantly observed beneath the serous surface (Figure 6).

In porcine pericardium, tissular plasmatic insudation was observed in 92.8% of evaluated fields. Plasmatic insudation was usually more or less extensive within tissue. On low magnification, coexistence of areas with poor or marked plasmatic insudation was frequently observed (Figure 6). In 71.4% of cases, the depth of infiltration exceeded half of the tissue thickness.

Conversely, no tissular plasmatic infiltration was observed in bovine pericardium (Figure 6).

DISCUSSION

Bovine and porcine pericardiums are routinely used for the manufacturing of bioprosthetic heart valves. Studies comparing the mechanical properties of both pericardiums are relatively scarce (10). To the best of our knowledge, the comparison of the hydraulic conductance of both types of pericardium has not been reported so far.

In the present study three main results were found when comparing porcine to bovine pericardium. First, the global hydraulic conductance was significantly higher for porcine pericardium. Second, the hydraulic conductance was not uniformly distributed over the porcine pericardial surface. Finally, the tissular plasmatic insudation was only detected in porcine pericardium.

The main goal of our work was to compare the hydraulic conductance of bovine and porcine pericardium, the two most commonly used tissues in the manufacturing of the current transcatheter prostheses. Having previously reported the occurrence of leaflet plasmatic insudation in a percutaneously inserted prosthesis very early (3hours) after its implantation, the experimental comparison of plasma insudation between porcine and bovine pericardium was also undertaken.

Tissular hydraulic conductance has been determined using either saline or Evans blue dye solution. Preliminary results have shown that these two measurements were highly correlated (personal communication). In a previous work, we reported that the saline hydraulic conductance of bovine pericardium was independent of the transmembrane pressure (8). Using Evans blue dye solution, we now confirm these results and extend them to porcine pericardium. Porcine pericardium was found to have a 5-fold higher hydraulic conductance in comparison to bovine pericardium. It has been suggested that a reduced tissue thickness might

be associated to an increased hydraulic conductance (11). Our results do not confirm this hypothesis.

In our previous work using bovine pericardium (purchased from a slaughterhouse), we noticed that pericardium hydraulic conductance was independent of tissue thickness within a range of 0.40 to 0.60mm. In that work, the mean hydraulic conductance was 171.2 ± 37.0 ml/h/m²/mmHg at 100 mmHg pressure, which is similar to the mean hydraulic conductance observed with thin porcine pericardium (tissue thickness: 0.12-0.25mm). Thus, a thicker pericardium might be associated with a high hydraulic conductance.

EB dye was able to stain both pericardiums during filtration. From a theoretical point of view, the stain fixation is dependent on the availability of the dye within the interstitium and on the affinity of the tissular binding sites. The availability of the dye is dependent on its concentration and on the transmembrane flux of the solution. In the present study, we found that the staining of both pericardiums was not uniform. This was particularly marked for the porcine pericardium (Figure 3). The correlation between the intensity of the staining and the local hydraulic conductance suggests that the dye tissular fixation was related to an increased local transmembrane flux of the dye solution. However, a regional difference in the affinity of the binding sites to the dye cannot be excluded.

Leaflets plasmatic insudation has been frequently described in bovine pericardium bioprostheses explanted for structural valve deterioration (9). It has been suggested that this lesion was the result of collagen matrix alteration (9, 12). Recently, plasmatic insudation has been observed in a transcatheter bioprosthesis explanted a few hours after its implantation (6). It was suggested that structural alteration induced by the crimping of the bioprosthesis was responsible for this insudation.

In the present work, it was demonstrated that plasmatic insudation did not occur in bovine pericardium (under the experimental conditions). This, therefore, confirms that tissular plasmatic insudation is unlikely to be observed in bovine pericardium with an unaltered matrix.

Plasmatic insudation was always observed in almost all porcine pericardial patches. Tissular extension could be important (Figure 6). Coexistence of areas with poor or marked plasmatic insudation was also observed on histology, suggesting local variation of tissular permeability to plasma. Based on the results of our study, the presence of areas of plasmatic tissue insudation within the pericardium of explanted porcine leaflets transcatheter prostheses could not necessarily reflect either a crimping-related tissue injury or tissue degeneration.

Transcatheter prostheses, nowadays, are increasingly being used. Crimping and deployment-related leaflet injury has already been described (7, 13). The magnitude of the lesions has been difficult to be assessed. The major reason is their multifocal distribution within tissue. If one assumes that the tissular hydraulic conductance is dependent on the organization of the pericardial extracellular matrix, then any alteration of this latter should result into a variation of the former. It is, therefore, logic to evaluate crimping related traumatic leaflet injury of transcatheter valves by studying their hydraulic conductance. In a previous study, our group has shown an increase in global leaflet hydraulic conductance following prosthesis crimping and deployment (8). The impact of prostheses crimping and deployment on local tissular permeability and leaflet plasmatic insudation is the subject of an ongoing study.

Finally, the present study has shown that porcine pericardium has an increased and more heterogeneous hydraulic conductance when compared to bovine pericardium. Porcine

pericardium, furthermore, was also demonstrated to have an increased plasmatic conductance leading to an increased plasmatic infiltration.

Conflict of interest: Rachid Zegdi is a stockowner of Cormove, a company that is developing a new percutaneous aortic valve.

Funding statement: This work was supported by Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT).

REFERENCES

1. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*. 2002;106(24):3006-8.
2. Cribier A, Eltchaninoff H, Tron C. [First human transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis in a case of severe calcific aortic stenosis]. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. 2003;52(3):173-5.
3. Eggebrecht H, Mehta RH. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2016;11(9):1029-33.
4. Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM, et al. 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;385(9986):2477-84.
5. Barbanti M, Petronio AS, Etti F, Latib A, Bedogni F, De Marco F, et al. 5-Year Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation With CoreValve Prosthesis. *JACC Cardiovascular interventions*. 2015;8(8):1084-91.
6. Zegdi R, Bruneval P, Blanchard D, Fabiani JN. Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2011;40(1):257-9.

7. Alavi SH, Groves EM, Kheradvar A. The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *The Annals of thoracic surgery*. 2014;97(4):1260-6.
8. Convelbo C, Guetat P, Cambillau M, Allam B, Bruneval P, Lafont A, et al. Crimping and deployment of balloon-expandable valved stents are responsible for the increase in the hydraulic conductance of leaflets. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2013;44(6):1045-50.
9. Hilbert SL, Ferrans VJ, McAllister HA, Cooley DA. Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprostheses. Histologic and ultrastructural studies. *Am J Pathol*. 1992;140(5):1195-204.
10. Aguiari P, Fiorese M, Iop L, Gerosa G, Bagno A. Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*. 2016;22(1):72-84.
11. Fingerote R, Fung HY, Rabkin SW. Hydraulic permeability of canine and human pericardium in vitro. *Basic Res Cardiol*. 1980;75(6):764-71.
12. Schoen FJ, Fernandez J, Gonzalez-Lavin L, Cernaianu A. Causes of failure and pathologic findings in surgically removed Ionescu-Shiley standard bovine pericardial heart valve bioprostheses: emphasis on progressive structural deterioration. *Circulation*. 1987;76(3):618-27.
13. de Buhr W, Pfeifer S, Slotta-Huspenina J, Wintermantel E, Lutter G, Goetz WA. Impairment of pericardial leaflet structure from balloon-expanded valved stents. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2012;143(6):1417-21.

FIGURE LEGENDS

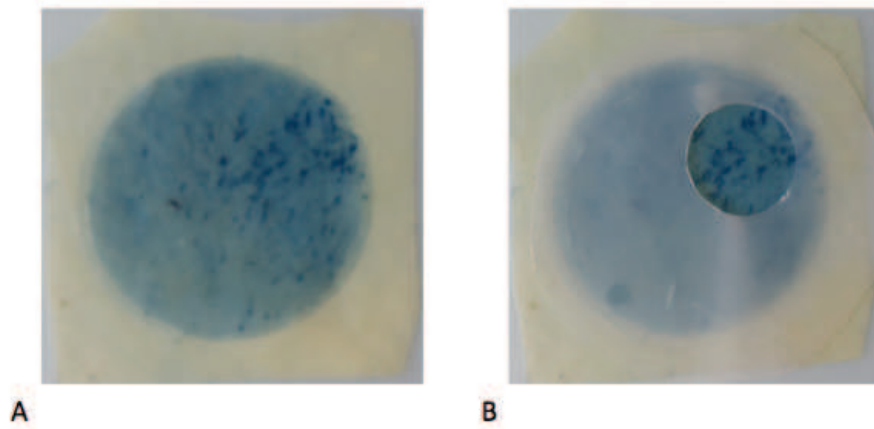


Figure 1: (A): A porcine pericardial patch after filtration with EB dye solution within the pressure chamber. (B): The plastic disc is positioned over a particular area for the determination of its local hydraulic conductance.

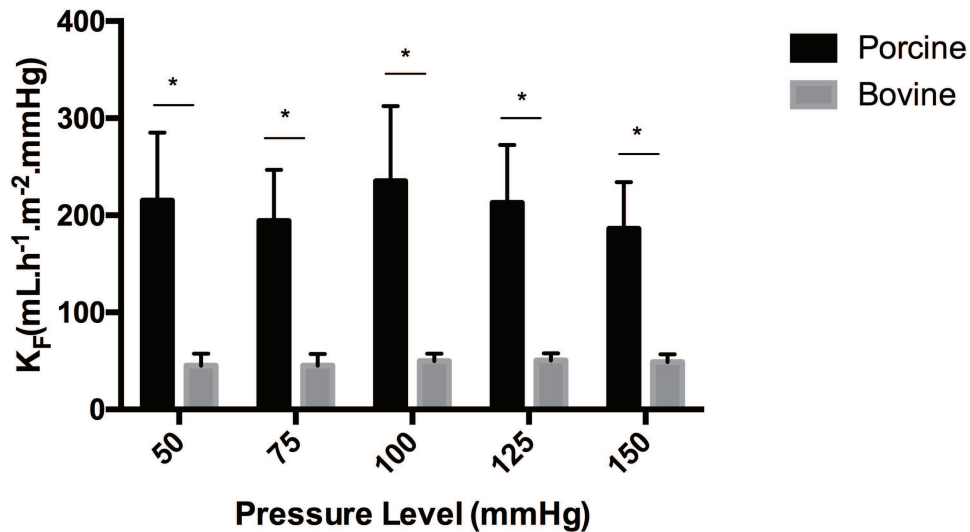


Figure 2: Influence of the pressure within the chamber on the Evans Blue dye solution hydraulic conductance of porcine and bovine pericardial patches. The global hydraulic conductance is independent of the pressure chamber and is 5-times higher for porcine pericardium compared to bovine pericardium for each pressure level (*: $p < 0.05$).

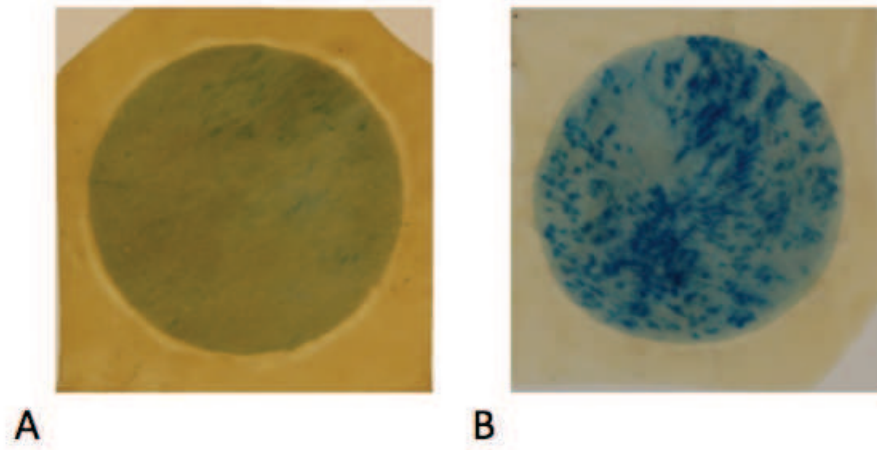


Figure 3: (A): Bovine pericardial patch after exposure to EB dye solution. (B) Porcine pericardial patch after exposure to EB dye solution. The tissue staining is more heterogeneous with the porcine pericardium.

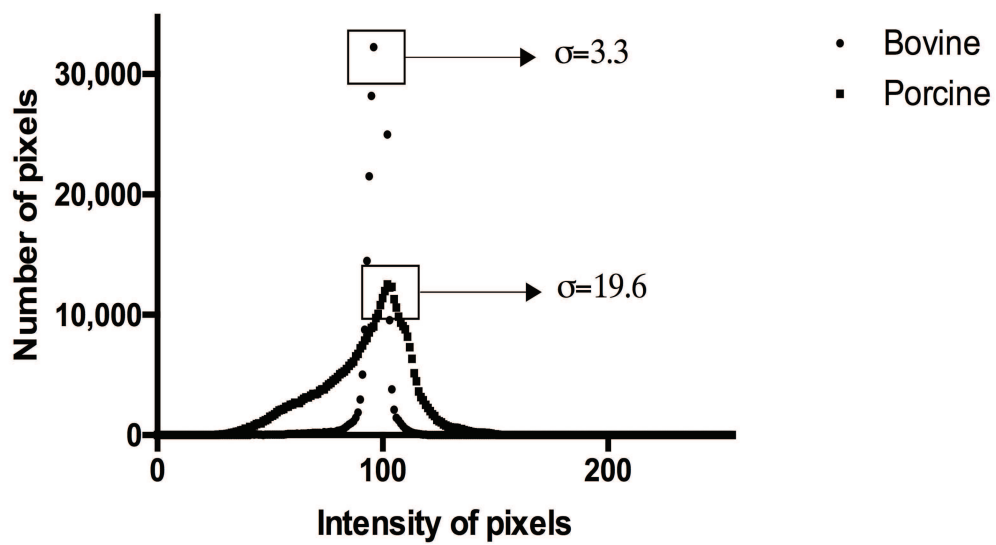


Figure 4: Typical distribution of the intensity of pixels for a porcine and a bovine pericardial patch after EB dye exposure. The standard deviation (σ) of each distribution is represented. The darkest areas (low intensity of pixels) are more frequent within the porcine pericardium.

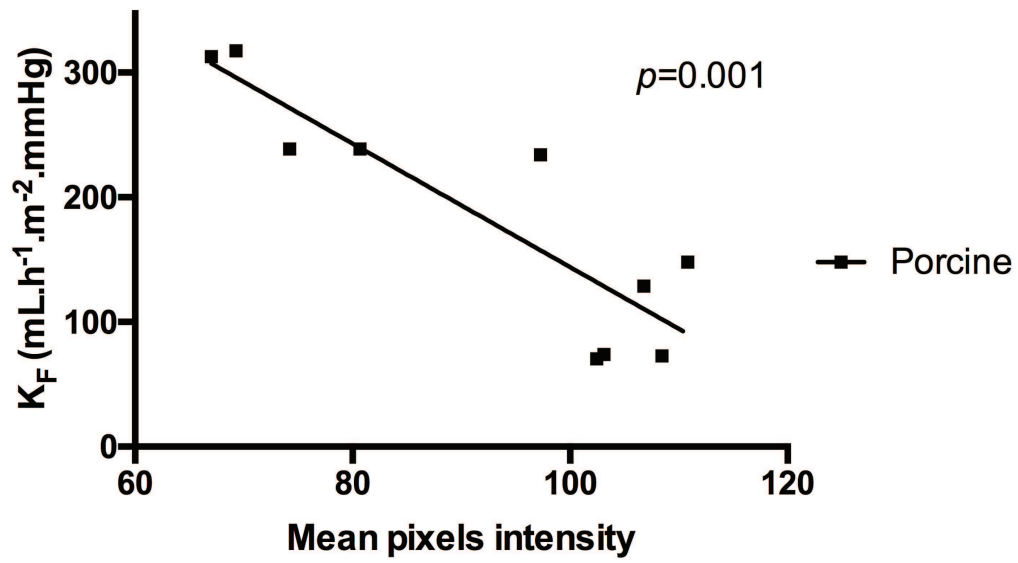


Figure 5: Correlation between the hydraulic conductance and the mean intensity of pixels within the studied local areas in the porcine group.

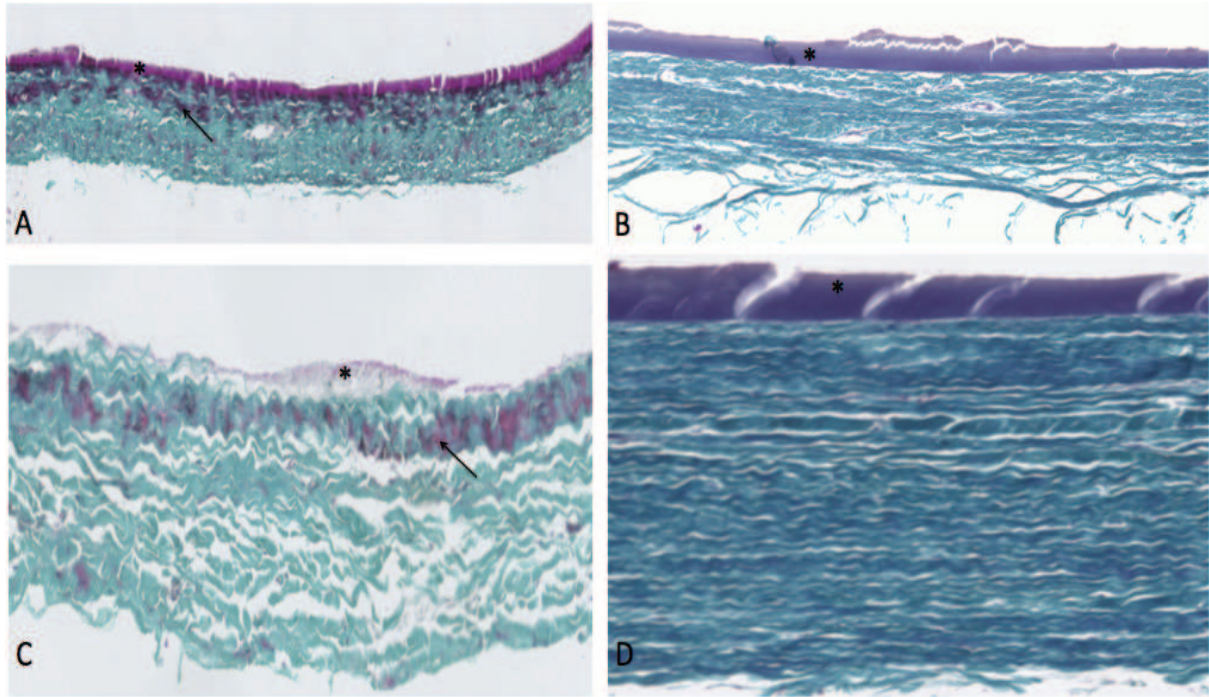


Figure 6: Histological section of porcine (A-C) and bovine (B-D) pericardium after exposure to plasma within the pressure chamber. The surface of each patch is covered with plasma (*). The tissular architecture was well preserved. Areas of plasmatic insudation (arrow) are predominantly located beneath the serous surface of the porcine tissue. No plasmatic insudation was seen in bovine pericardium. (Masson's Trichrome staining; $\times 10$ magnification (A-B); $\times 20$ magnification (C-D)).

ETUDE 2

INTRODUCTION

Le remplacement valvulaire aortique percutané est de plus en plus pratiqué en Europe et aux USA. Cette stratégie apporte une alternative clinique solide pour les patients atteints d'une sténose aortique sévère n'étant pas éligible au remplacement valvulaire chirurgical.

Sur le marché il existe actuellement deux types de valves percutanées, celles déployées par ballonnet et les auto-expansibles. Ces bioprothèses sont constituées de feuillets de péricarde bovin ou porcine montés sur un stent en acier ou en nitinol. L'ensemble est serti à un diamètre variant entre 16F et 18F afin d'être délivré par les voies d'abord.

Des études portant sur l'impact du sertissage sur la structure du péricarde ont été publiées. Il a été observé des altérations du péricarde quelque soit le type de bioprothèse utilisée. Notre équipe a pu mettre en évidence dans une étude histologique antérieure, que les valves déployées par ballonnet induisaient plus de fractures de faisceaux de collagène que les auto-expansibles sur du péricarde bovin.

Dans cette étude, nous avons cherché à comparer les conséquences du sertissage de ces deux types de bioprothèses. Pour cela nous avons analysé si ce processus pouvait entraîner des modifications de la structure ainsi que de la perméabilité des péricardes porcins et bovins vis à vis de différents solutés.

Les résultats de ces travaux confirment que le sertissage et le déploiement par ballonnet provoque une hausse de la perméabilité hydraulique du péricarde. Il a été observé des zones d'altération, après déploiement, sur les péricardes porcins et bovins issus des deux types de bioprothèses. De plus, les altérations induites par le sertissage et le déploiement entraînent une hausse de l'insudation plasmatique sur les deux types de bioprothèses. L'ensemble des tests

effectué suggère un traumatisme péricardique plus important pour les prothèses avec déployable par ballon avec péricarde bovin comparativement aux prothèses auto-expansibles avec péricarde porcin.

Traumatic leaflet injury: Comparison
of porcine leaflets self-expandable and
bovine leaflets balloon-expandable
prostheses.

Traumatic leaflet injury: Comparison of porcine leaflets self-expandable and bovine leaflets balloon-expandable prostheses.

Channing Convelbo, MSc², Hanane El Hafci², Hervé Petite, PhD², Rachid Zegdi, MD, PhD^{1,3}

Affiliations:

- 1) René Descartes University, Paris V, France
- 2) CNRS UMR 7052 Osteo-Articular Bioengineering and Bioimaging Laboratory (B2OA) – Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, Paris
- 3) AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

Corresponding author: Channing Convelbo; Osteo-Articular Bioengineering and Bioimaging Laboratory (B2OA); 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris.

E-mail address: c.convelbo@gmail.com

Telephone: +33(0)1 57 27 85 70

Fax: +33(0)1 57 27 85 71

Key words: Balloon-expandable; Self-expandable; Crimping; bovine pericardium; Porcine pericardium; TAVI

Word Count: 4055 words.

ABSTRACT

Aim: The main goal of the present study was to compare the occurrence of post-deployment leaflet injury between prostheses made of porcine or bovine pericardium.

Methods and Results: Two types of prostheses were used: on one side, self-expandable prostheses with porcine pericardial leaflets and, on the other side, balloon-expandable prostheses with bovine pericardial leaflets. In each group, crimped prostheses were compared to control non-crimped prostheses. Following a 15-min period of crimping, prostheses were deployed and their leaflets were removed and subjected to analyses. These latter included determination of leaflets global and local hydraulic conductance, leaflets plasma insudation and microscopic analysis. The results were expressed as percentage (standard error of the mean) or median (interquartile range).

A significant increase in global hydraulic conductance was only observed in crimped balloon-expandable prostheses: 20.1 (15.5, 41.2) ml/h/m²/mmHg vs. 12.3 (9.0, 15.6) ml/h/m²/mmHg, (p= 0.021). Likewise, areas of marked staining (a marker of local hydraulic conductance) were only seen in bovine pericardium balloon-expandable prostheses. The incidence of leaflet plasmatic insudation was increased in crimped prostheses compared to control prostheses. The microscopic study revealed a higher occurrence of traumatic lesions in crimped prostheses in comparison with control prostheses: 33.3 ± 21.1 % vs. 5.5 ± 5.5 % (p=0.039) and 44.4 ± 20.5 % vs. 5.5 ± 5.5 % (p=0.017) in bovine and porcine leaflets, respectively.

Conclusion: Post-deployment leaflets injury occurred in both types of prostheses. Alteration of global and local hydraulic conductance, however, was more important in bovine pericardium balloon-expandable prostheses.

INTRODUCTION

Percutaneous aortic valves are now commonly implanted in Europe and in the US [1]. Those devices offer a therapeutic alternative for patients suffering from severe aortic stenosis and considered at high risks for surgery [2]. In most cases of transcatheter aortic valve implantation (TAVI), two types of bioprostheses are used: the bovine pericardium balloon-expandable SAPIEN-3 prosthesis and the porcine pericardium self-expandable CoreValve prosthesis [3]. There are very limited medium-term data regarding the durability of these prostheses [4-7].

There is growing evidence that leaflets injury occurs during crimping or deployment of these prostheses [8, 9]. Leaflets injury has been well documented by microscopic ultrastructural studies [10, 11]. It has been hypothesized that these post-deployment injuries might jeopardize the prostheses durability. Data confirming or infirming this hypothesis is still lacking.

Limited data regarding the factors influencing the severity of post-deployment leaflet injury are available. Using bovine pericardium self-expandable prostheses, Alavi and coll. have shown that the severity of post-deployment leaflets injury was dependent on the degree of prosthesis crimping [10]. Amahzoune and coll. have also reported that post-deployment leaflets injury was more severe in bovine pericardium balloon-expandable prostheses in comparison with bovine pericardium self-expandable prostheses, thus underscoring the deleterious effect of balloon-inflation on leaflet integrity [12].

To the best of our knowledge, impact on incidence of leaflets injury has not been compared between porcine pericardium self-expandable (or "CoreValve-like" prosthesis) and bovine pericardium balloon-expandable ("SAPIEN-like" prosthesis) bioprostheses. This is the main purpose of the present study.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Pericardial samples:

Samples of bovine and porcine pericardium were purchased from a manufacturer (Neovasc, British Columbia, Canada). The samples were delivered in a 0.625% glutaraldehyde solution.

Sheets were cut into square (25×25mm) patches. The rough (or fibrous) and smooth (or serous) faces of the pericardial tissue were visually distinguished.

Before each experiment, tissue thickness was measured with a micrometer (Mitutoyo, Takatsu-ku, Japan) working between 0.01 and 10 mm. The thickness was measured at the center of each pericardial patch. Values were taken after a stabilization period of 5 s. All porcine leaflets had a thickness ranging from 0.12 to 0.25mm (mean: 0.16mm) while bovine pericardial leaflets from 0.32 to 0.38mm (mean: 0.36mm).

Valved stent construction:

Two types of valved-stents (VSs) were constructed. The first one with three bovine pericardial leaflets mounted onto a balloon-expandable metallic stent and the second one with three porcine pericardial leaflets mounted onto a self-expandable laser cut nitinol stent. The two types of stent that were used were those for the manufacturing of the balloon-expandable SAPIEN-3 bioprosthesis (Edwards Lifesciences, Irvine, CA) and those for the manufacturing of self-expandable Cormove bioprosthesis (Cormove, Bornel, France).

Valve stent crimping:

The balloon-expandable VSs were progressively crimped onto a 22-mm valvuloplasty balloon (B-Braun, Melsungen, Germany) using a specific crimper (Edwards Lifesciences, Irvine, CA). The VSs were left compressed for 15 minutes at 5.4mm (16F) external diameter. During that time, the prostheses were flushed with saline to prevent leaflets dessication. For expansion, the balloon was inflated with a saline-filled syringe. Complete deployment was achieved within 5-6s. Balloons were maintained fully inflated at 2 bars for 5 additional seconds.

Using the same crimper the self-expandable VSs were progressively crimped and transferred into a 5.4mm (16F) internal diameter metallic tube. The VSs were left compressed for 15 minutes and were regularly flushed with saline. Prosthesis expansion was achieved by pushing the VSs out of the tube with a specific tappet.

Pressure chamber:

Determination of the hydraulic conductance of pericardial patches with a pressure chamber has been previously described. Briefly, the pressure chamber consisted in a cylindrical tube filled with a fluid. Pericardial patches were placed between two 'pistons' with the smooth (serous) surface always directed toward the fluids. The superior and inferior 'pistons' had a central coaxial orifice of 21.5-mm diameter. The chamber was connected by a three-way cock valve to a rotating syringe filled with the same fluid as in the pressure chamber. The three-way cock valve was also connected to a mercurial manometer to measure the pressure within the chamber. A container was placed on a weighting scale positioned under the pressure chamber. The amount of collected fluids was measured and used for the calculation of the tissue hydraulic conductance (Kf). To calculate the hydraulic conductance of the pericardial

patches, the density of fluids that were used was assumed to be $\rho = 1.00$ g/ml. The hydraulic conductance formula was $K_f = m/\rho \cdot t \cdot S \cdot P$, where m (g) corresponded to the mass of the collected fluid within a given time period, t (h) the time period during which the solution was collected, S (m²) the surface of the pericardium directly in contact with the fluid and P (mmHg) the pressure within the chamber. All measurements were performed at ambient temperature.

Methods

To evaluate tissue injury, several methods were used. Histology usually shows the tissular alterations but quantification is difficult due to the complexity and the uneven distributions of the lesions. To better quantify tissue injury, quantitative methods were developed by our group. They relied on the determination of tissue permeability (to saline or plasma) that is altered following disorganization/destruction of the extracellular matrix [9].

Histology:

After storage in 10% phosphate-buffered formalin, the pericardial patches were dehydrated and then embedded in paraffin. The paraffin-embedded tissue was cut into 7- μ m thick slices using a rotatory microtome Leica RM2135 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and stained with Masson's trichome. The samples were analyzed and digitalized pictures were obtained at x20 magnification. For each leaflet, three randomly chosen sections were analyzed.

Histology was used to determine the presence or absence of fibrin deposits within tissue and areas of tissue compression. Prevalence of plasma insudation compression areas was

expressed as percentages. For the histological analysis, the observer was blinded to the groups to which the samples belonged.

Tissue permeability and plasmatic insudation:

Global hydraulic conductance was determined using an Evans blue dye solution within the pressure chamber (20mg/L). The pressure within the chamber was set at 250mmHg during 20min for bovine pericardium and at 100mmHg during 10min for porcine pericardium.

After exposure to the EB dye solution, the serous surface of each patch was digitalized using a digital camera Nikon D40 (Nikon, Shinjuku, Japan). Using ImageJ, the relative distribution of pixels according to their intensity was determined for each patch. The pressure chamber was also used to induce plasmatic insudation in pericardial patches. The chamber was filled with a bovine plasma solution (Biowest, Riverside, USA). The patches were exposed to plasma during 20min at a pressure of 75 mmHg. This pressure was close to that sustained by valve leaflets after their closure. The time of exposure was based on preliminary studies (data not shown).

Experimental protocol

Experiment 1: Preliminary study

The aim of this experiment was to study the impact of a localized trauma of pericardial patches on their global hydraulic conductance and their EB dye staining.

Bovine and porcine pericardial patches (n=5/types) were placed within a pressure chamber filled with EB dye solution. After exposure, patches were removed and photographs were taken. A brief (2s) manual compression with the bottom of an Eppendorf tube was performed in one distinct area located in a poorly stained part of each patch. The “traumatized” patches were then mounted within the pressure chamber for an additional EB dye exposure. Finally, patches were removed and photographed. Tissue hydraulic conductance was also determined before and after trauma.

Experiment 2: EB dye hydraulic conductance and staining

The aim of this study was to evaluate the impact of VSs crimping and deployment on the leaflets EB dye hydraulic conductance and staining.

Each type of VS was randomly assigned to one of two groups: There were, therefore, four groups (n=4/ group): the porcine self-expandable prostheses that were crimped (SE-Crimping) or not crimped (SE-Control) and the bovine balloon-expandable prostheses that were crimped (BE-Crimping) or not crimped (BE-Control).

Leaflets were removed and placed within the pressure chamber for determination of hydraulic conductance. The global hydraulic conductance and the relative distribution of pixels intensity were evaluated for each patch.

Experiment 3: Leaflets plasmatic infiltration and leaflets tissular compression

The aim of this study was to evaluate the impact of VSs crimping and deployment on the leaflets plasmatic infiltration and on the presence of tissular compression areas.

The VSs were also randomly divided into four groups (n=6 patches/group). Balloon- and self-expandable prostheses were crimped to 5.4 mm (16F) external diameter for 15 minutes before re-expansion. In the last two groups (BE-Control) and (SE-Control), VSs were not crimped. Leaflets underwent plasma filtration within the pressure chamber. At the end of the experiment, the patches were removed and processed for histological examination. The plasmatic infiltration and the presence of compression areas were evaluated for each patch.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was performed using SPSS Statistics Version 20.0 (IBM, New York, USA). Qualitative variables were expressed as mean \pm standard error of the mean while quantitative variables were expressed as median (interquartile range). Comparisons between variables were performed using paired and unpaired Wilcoxon test, Chi-2 or Fisher exact tests when appropriate. Statistical significance was defined as a P-value <0.05 .

RESULTS

Experiment 1: Preliminary study

A blue central disc was visible on each pericardial patch after exposure to the EB dye solution (Figure 1). The staining was rather homogeneous for bovine pericardium, whereas for porcine pericardium, more or less colored areas were visible.

After crushing, an area of tissue trauma was clearly visible in each case as one markedly colored spot (Figure 1).

In the porcine group, the EB dye hydraulic conductance significantly increased after tissue trauma from 386.7 (112.2 - 458.3) ml/h/m²/mmHg to 816.4 (645.5 - 1566.1) ml/h/m²/mmHg, (p= 0.04).

In the bovine group, the EB dye hydraulic conductance was also significantly higher after tissue crushing: 10.2 (9.6 - 14.2) ml/h/m²/mmHg vs. 4.9 (4.3 - 9.2) ml/h/m²/mmHg, (p= 0.04).

Experiment 2: EB dye hydraulic conductance and staining

The global EB dye hydraulic conductance for non-crimped pericardium was significantly higher for porcine compared with bovine pericardium 153.3 (123.4 - 270.3) ml/h/m²/mmHg vs. 12.3 (9.0 - 15.6) ml/h/m²/mmHg, (p< 0.001).

In the porcine group, the EB dye hydraulic conductance did not differ between the SE-Crimping and the SE-Control group: 225.3 (190.0 - 340.5) ml/h/m²/mmHg vs. 153.3 (123.4 - 270.3) ml/h/m²/mmHg, (p= 0.12), respectively.

In the bovine group, however, the EB dye hydraulic conductance was significantly higher in the BE-Crimping group compared with the BE-Control group: 20.1 (15.5 - 41.2) ml/h/m²/mmHg vs. 12.3 (9.0 - 15.6) ml/h/m²/mmHg, (p= 0.021).

After exposure to EB dye, the macroscopic examination of patches revealed that porcine pericardium (SE-Crimping and SE-Control groups) had a heterogeneous coloration (Figure 2). Conversely, the serous surface of control bovine pericardium had a homogeneous staining. In the BE-crimping group, however, local areas of marked coloration were detected (Figure 2).

In both types of crimped prostheses, there was a shift to the left of the curve representing the cumulative distribution of pixels according to their intensity (Figure 3). At low pixel intensity (<50 –“representing dark areas”) there was a significant increase in the cumulative proportions of pixels in the crimped bovine pericardium prostheses compared to the non-crimped bovine pericardium prostheses (Figure 3). This was not the case with the crimped porcine pericardium prostheses for which a significant increase of the cumulative proportion of pixels was seen at an intermediate level of pixels intensity ($50 \leq \text{intensity} \leq 100$).

Experiment 3: Leaflets plasmatic insudation and leaflets tissular compression

On histological analysis, plasmatic insudation was detected in each group (Figure 4). Occurrence of plasmatic infiltration was significantly higher in control porcine pericardium prostheses in comparison with control bovine pericardium: 92.8 ± 7.1 % vs. 5.5 ± 5.5 %, (p<0.001).

In the porcine group, there was no difference between crimped and controls VSs regarding the presence of plasmatic infiltration: 94.4 ± 5.5 % vs. 92.8 ± 7.1 %, for the SE-crimped and SE-control groups, respectively ($p=0.7$). The rate of fields with a plasmatic infiltration depth exceeding $3/4$ of the tissue thickness was 57.1 ± 13.7 % in the control group and 94.4 ± 5.5 % in the crimped group ($p=0.017$).

In the bovine group, there was a significant difference between crimped and controls VSs regarding the occurrence of plasmatic infiltration: 56.2 ± 12.8 % vs. 5.5 ± 5.5 %, for the BE-crimped and BE-control groups, respectively ($p=0.005$).

Areas of tissular compression were frequently found in leaflets from crimped prostheses (Figure 5). In the porcine group, the occurrence of leaflets with microscopically detectable compression areas was significantly higher in the crimped prostheses compared with the control prostheses: 44.4 ± 20.5 % vs. 5.5 ± 5.5 %, ($p=0.017$). In the bovine group, leaflets with microscopic compressions areas were also more frequent within the crimped prostheses in comparison to the control prostheses: 33.3 ± 21.1 % vs. 5.5 ± 5.5 %, ($p=0.039$).

DISCUSSION

The present study was designed to address two major issues. First, to better characterize the traumatic leaflet injury due to prosthesis crimping and/or deployment. This injury has traditionally been assessed by histology [8, 13]. Microscopic analysis, however, has several drawbacks: it is time consuming and uneven distribution or complexity of the lesions makes quantification difficult. Second, to determine whether post-deployment leaflet injury is more severe in porcine leaflet self-expandable ("CoreValve-like" prosthesis) or bovine leaflet balloon-expandable prostheses ("SAPIEN-like" prosthesis).

A few experimental studies have shown microscopic alterations of bovine pericardium leaflets obtained from deployed self- or balloon-expandable prostheses [8, 10, 13]. Lesions consisted in collagen fibers compression, fracture or dissociation. In the present study, we have also observed such alterations in bovine pericardium balloon-expandable prostheses (Figure 5). We here describe, for the first time, the presence of areas of tissular compression in crimped (16F) porcine pericardium self-expandable prostheses. Traumatic leaflet injury is, therefore, possible for porcine or bovine pericardium self- or balloon-expandable prostheses.

In our preliminary study, a local trauma of bovine or porcine pericardium was associated with an increase in global leaflet hydraulic conductance and in Evans blue dye staining. This confirms that global or local leaflet hydraulic conductance can be used as a marker of tissue trauma. Global leaflet hydraulic conductance was found significantly increased only in crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses.

Markedly colored areas (pixel intensity <50) were also significantly more frequent only in crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses (compared to non-crimped bovine pericardium) (Figure 2 and Figure 3). The observed alterations in global and local tissue

permeability suggest that tissue trauma was more severe with bovine pericardium balloon-expandable prostheses compared to porcine pericardium self-expandable prostheses.

Leaflet plasmatic insudation has been frequently described in pericardial bioprostheses explanted for late structural valve deterioration [14]. Recently, plasmatic insudation has been observed in a SAPIEN prosthesis explanted a few hours after its implantation [8]. It was suggested that structural alteration induced by the crimping and/or the deployment of the bioprosthesis was responsible for this insudation. In the present study, occurrence of leaflet plasmatic insudation was 10-times higher in crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses compared to non-crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses. Leaflet permeability to macromolecules is, therefore, increased in crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses after their deployment.

Another previously unknown observation is that leaflet permeability to plasma is higher in porcine pericardium in comparison with bovine pericardium. In control porcine pericardium, areas of plasmatic insudation were found in 93% of studied fields. Despite this high rate of plasmatic insudation, crimping-related increase in porcine leaflet permeability to plasma was suggested by an increased incidence of plasmatic areas in the deeper layers of the pericardial tissue from crimped prostheses compared to non-crimped prostheses.

Tissue compression per se can be responsible for traumatic lesions [15]. Our data suggests that crimping/deployment-related leaflet injury might be more severe in bovine pericardium balloon-expandable prostheses. There are two reasons at least. First, bovine pericardium (mean thickness: 0.36 mm) is thicker than porcine pericardium (mean thickness: 0.16 mm). Then, for a similar degree of prostheses crimping, tissue compression and folding (or bending stress) are necessarily more important with bovine pericardium. Second, during balloon inflation, pericardial tissue is also compressed against the struts of the stent.

Two types of prostheses are used in most cases of TAVI (more than 95% of cases in the French registry [16]). One (the CoreValve) is a porcine pericardium self-expandable prosthesis and the other one (the SAPIEN-3) is a bovine pericardium balloon-expandable prosthesis. These prostheses are designed to be used with a 16F introducer. In our study, tissular traumatic alterations were observed in crimped (16F) porcine pericardium self-expandable and bovine pericardium balloon-expandable prostheses after their deployment. Furthermore, the study of global and local tissue permeability has suggested that tissue trauma was more severe with bovine pericardium balloon-expandable prostheses in comparison with porcine pericardium self-expandable prostheses. Occurrence of post-implantation leaflet injury, therefore, is one of the key differences between percutaneously and surgically implanted prostheses.

As bioprostheses, percutaneously implanted prostheses will fail over time from structural valve deterioration. Structural valve deterioration is a complex phenomenon, not completely understood, and involving numerous factors inherent to the tissue (including its integrity), the prostheses design and the host biology. The question of a negative impact of post-deployment tissue injury on prostheses durability is still debated. One should insist on the fact that clinical data confirming or infirming an increased risk of structural valve deterioration following tissue trauma are still lacking at the present time. Results of long-term studies will eventually provide the answer to the medical community.

Funding statement: This work was supported by Agence Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)

Conflict of interest: Rachid Zegdi is a stockowner of Cormove, a company that is developing a new percutaneous aortic valve.

FIGURE LEGENDS

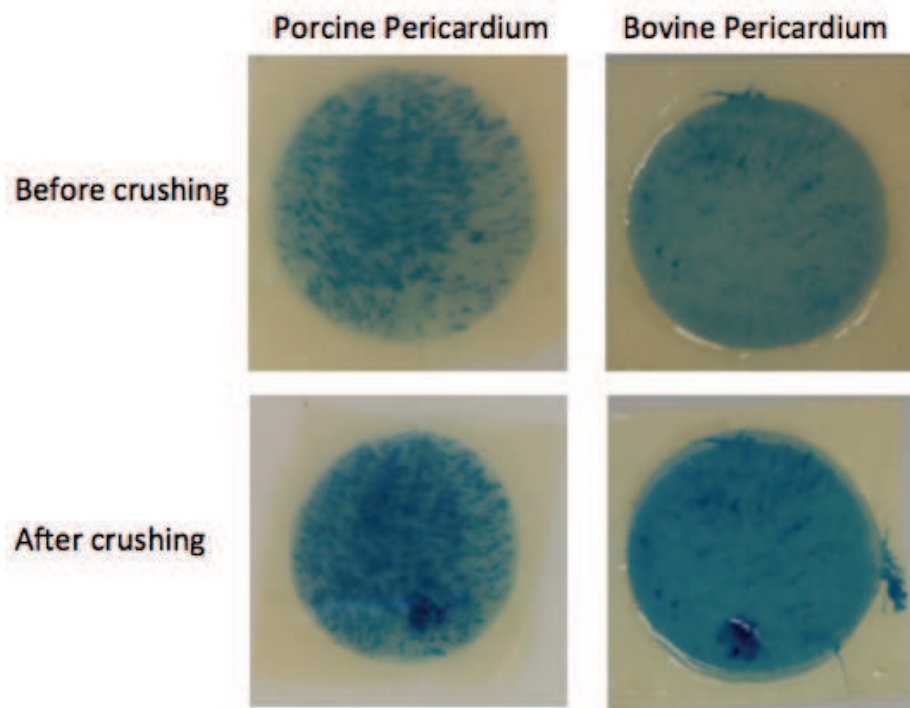


Figure 1: A porcine (Top-left) and a bovine (Top-right) pericardial patch after filtration with Evans blue dye solution within the pressure chamber. The same porcine (Bottom-left) and bovine (Bottom-right) pericardial patches after exposure to Evans blue dye following a local tissular crushing. The crushed areas appear as markedly colored spots.

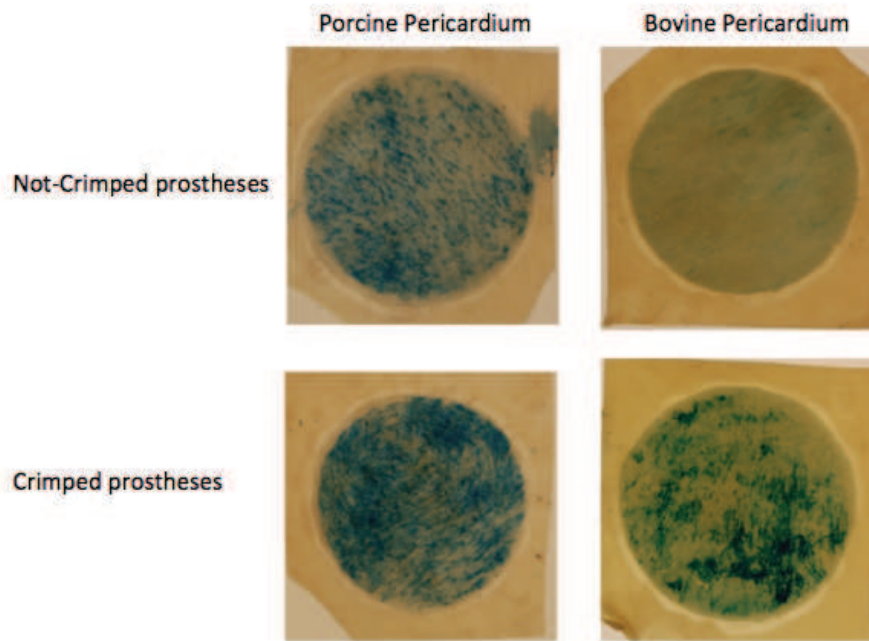
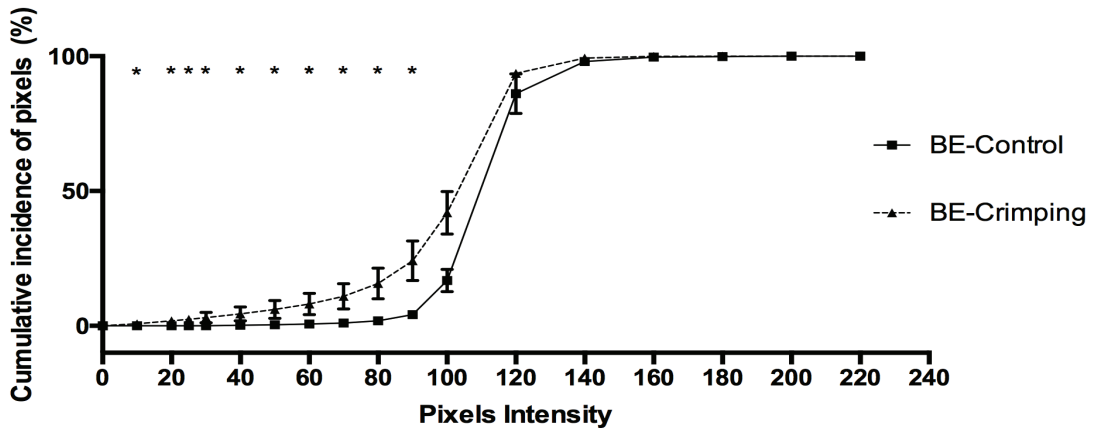
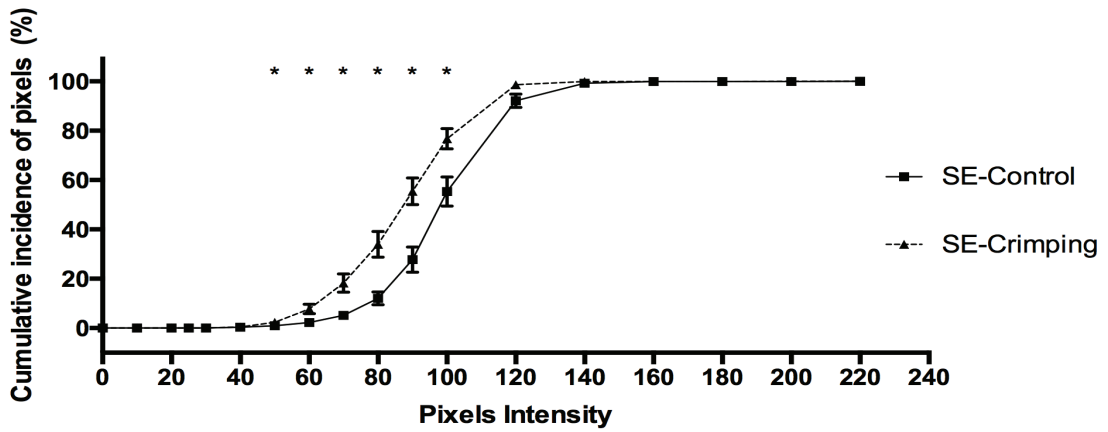


Figure 2: A control porcine (Top-left) and bovine (Top-right) pericardial patch after filtration with Evans Blue dye solution within the pressure chamber. A crimped porcine (Bottom-left) and bovine (Bottom-right) pericardial patch after filtration with Evans Blue dye solution within the pressure chamber. Areas of marked staining were present in leaflets from crimped bovine pericardium balloon-expandable prostheses.



A



B

Figure 3: Curves representing the cumulative incidence of pixels according to their intensity for crimped and control balloon-expendable prostheses (A) as well as for crimped and control self-expendable prostheses (B). For both types of crimped prostheses, the curve of pixels distribution was shifted to the left. (*) represent a significant difference ($p < 0.05$) in the cumulative incidence of pixels between crimped and non-crimped prostheses.

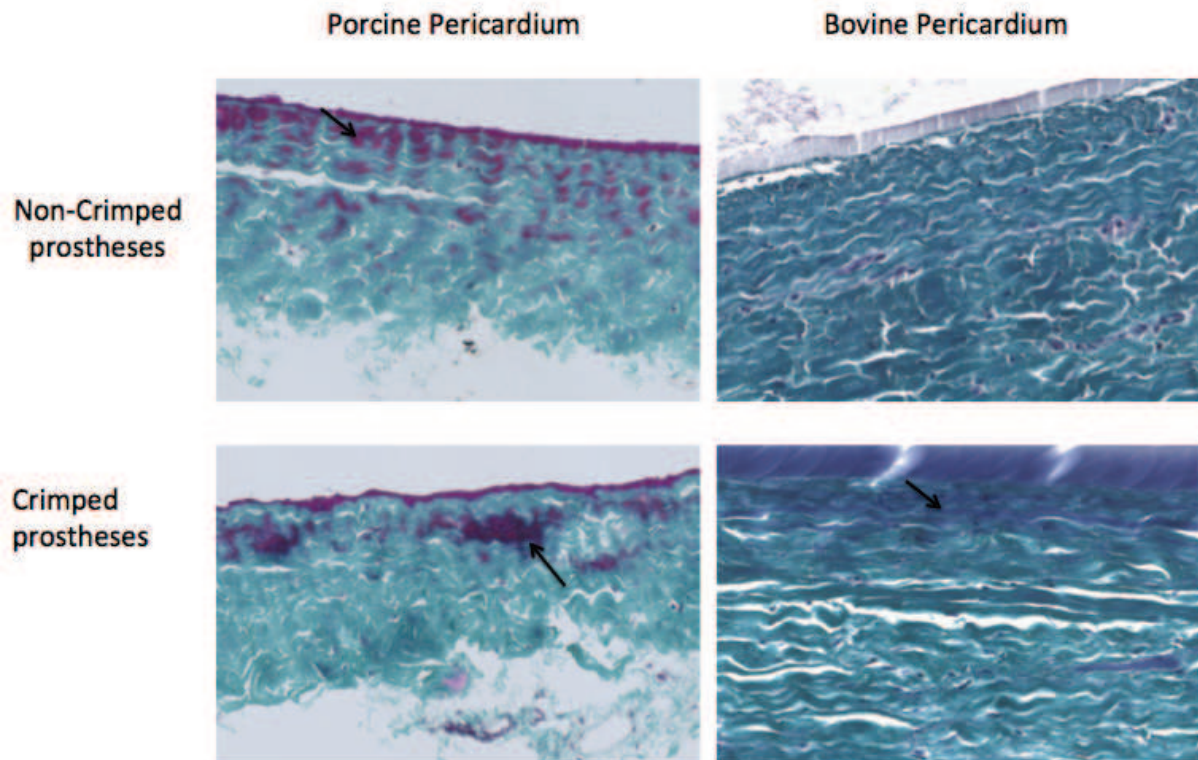


Figure 4: Histological sections of a control porcine (Top-left), control bovine (Top-right), crimped porcine (Bottom-left) and crimped bovine (Bottom-right) pericardial patch. Areas of plasmatic insudation (arrows) were detected in almost all porcine control or crimped leaflets. These areas were exceptional in bovine control leaflets and frequently observed in bovine pericardium crimped prostheses. (Masson's Trichrome staining; $\times 20$ magnification).

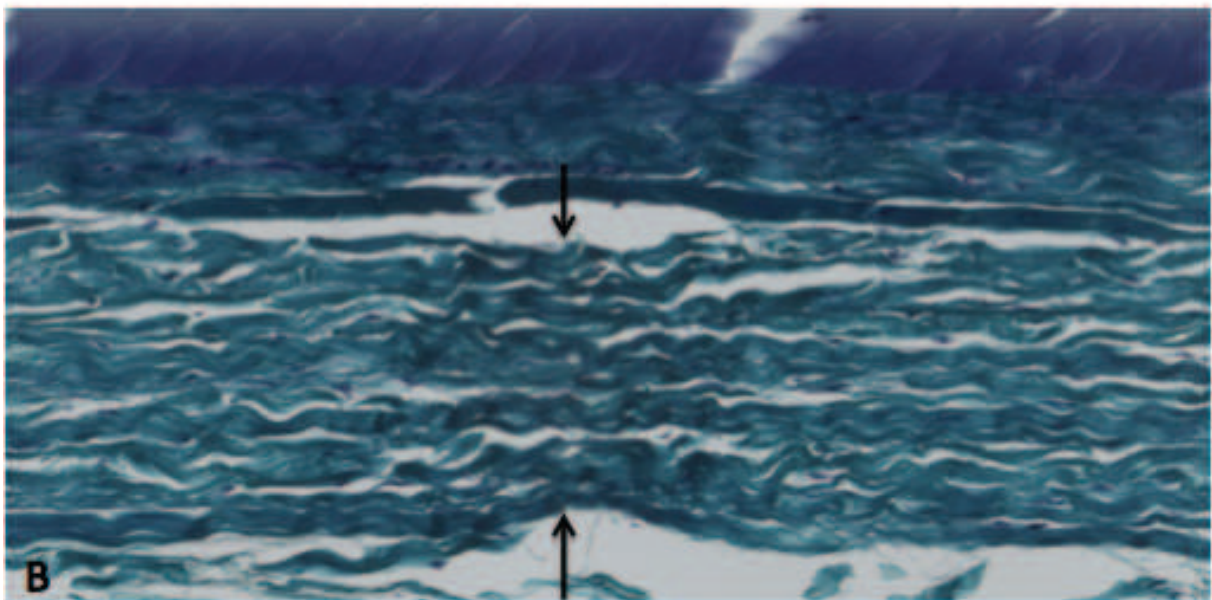
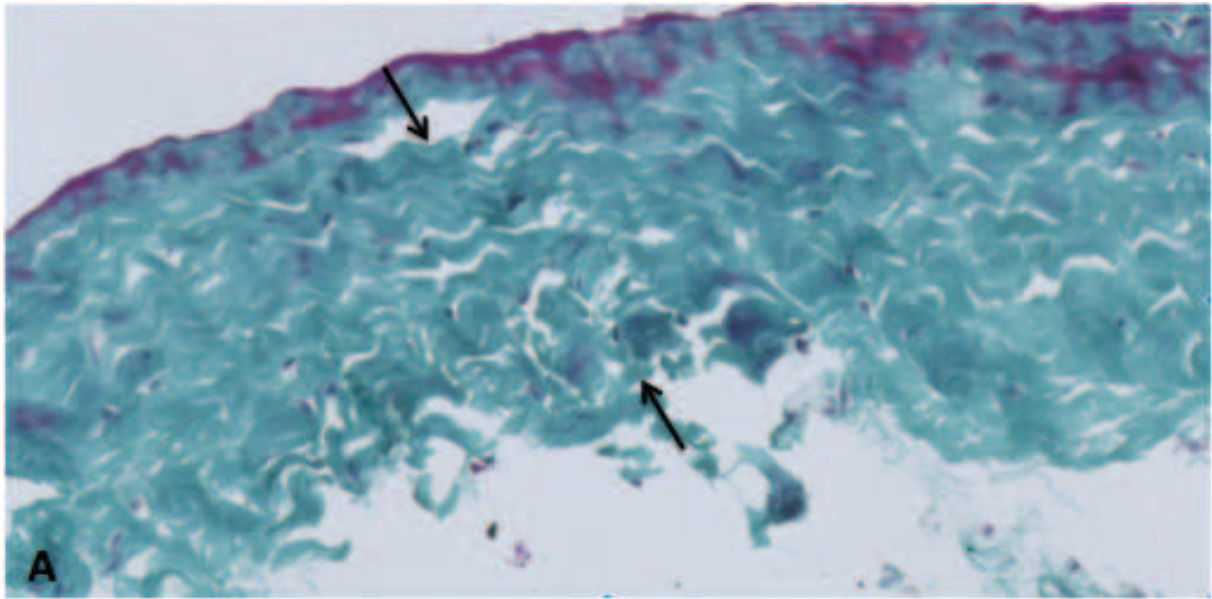


Figure 5: Histological sections of a crimped porcine (Top) and crimped bovine (Bottom) pericardial patch. Typical areas of tissue compression (arrows) are shown. (Masson's Trichrome staining; $\times 20$ magnification).

REFERENCES

- [1] Eggebrecht H, Mehta RH. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention* : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology 2015;11.
- [2] Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation* 2002;106:3006-8.
- [3] Kilic T, Yilmaz I. Transcatheter aortic valve implantation: a revolution in the therapy of elderly and high-risk patients with severe aortic stenosis. *J Geriatr Cardiol* 2017;14:204-17.
- [4] Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM et al. 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet* 2015;385:2477-84.
- [5] Barbanti M, Petronio AS, Etti F, Latib A, Bedogni F, De Marco F et al. 5-Year Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation With CoreValve Prosthesis. *JACC Cardiovascular interventions* 2015;8:1084-91.
- [6] Toggweiler S, Humphries KH, Lee M, Binder RK, Moss RR, Freeman M et al. 5-year outcome after transcatheter aortic valve implantation. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:413-9.
- [7] Webb J, Gerosa G, Lefevre T, Leipsic J, Spence M, Thomas M et al. Multicenter evaluation of a next-generation balloon-expandable transcatheter aortic valve. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2235-43.

- [8] Zegdi R, Bruneval P, Blanchard D, Fabiani JN. Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2011;40:257-9.
- [9] Convelbo C, Guetat P, Cambillau M, Allam B, Bruneval P, Lafont A et al. Crimping and deployment of balloon-expandable valved stents are responsible for the increase in the hydraulic conductance of leaflets. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2013;44:1045-50.
- [10] Alavi SH, Groves EM, Kheradvar A. The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *The Annals of thoracic surgery* 2014;97:1260-6.
- [11] Bourget JM, Zegdi R, Lin J, Wawryko P, Merhi Y, Convelbo C et al. Correlation between structural changes and acute thrombogenicity in transcatheter pericardium valves after crimping and balloon deployment. *Morphologie* 2016.
- [12] Amahzoune B, Bruneval P, Allam B, Lafont A, Fabiani JN, Zegdi R. Traumatic leaflet injury during the use of percutaneous valves: a comparative study of balloon- and self-expandable valved stents. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery* 2013;43:488-93.
- [13] de Buhr W, Pfeifer S, Slotta-Huspenina J, Wintermantel E, Lutter G, Goetz WA. Impairment of pericardial leaflet structure from balloon-expanded valved stents. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 2012;143:1417-21.
- [14] Hilbert SL, Ferrans VJ, McAllister HA, Cooley DA. Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprostheses. Histologic and ultrastructural studies. *Am J Pathol* 1992;140:1195-204.

[15] Munnelly AE, Cochrane L, Leong J, Vyavahare NR. Porcine vena cava as an alternative to bovine pericardium in bioprosthetic percutaneous heart valves. *Biomaterials* 2012;33:1-8.

[16] Auffret V, Lefevre T, Van Belle E, Eltchaninoff H, Iung B, Koning R et al. Temporal Trends in Transcatheter Aortic Valve Replacement in France: FRANCE 2 to FRANCE TAVI. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:42-55.

ETUDE 3

INTRODUCTION

Dans notre précédente étude, nous avons pu observer des zones d'altération de compression sur les péricardes issus des deux types de bioprothèses. Toutefois les conséquences de ces lésions ont été très peu abordées dans la littérature. Plusieurs auteurs ont pu établir un lien entre l'altération des faisceaux de collagène du péricarde et la calcification prématurée de bioprothèses chirurgicales. Cependant, dans le cas des bioprothèses percutanées, très peu d'études ont été faite sur l'impact de ces lésions sur le comportement mécanique du péricarde. Dans les travaux de Khoffi & Heim portant sur de la traction uniaxiale, les auteurs ont pu observer une altération de la contrainte maximale à la rupture du péricarde bovin après sertissage (10F) d'une bioprothèse auto-expansible.

Actuellement de nombreux fabricants se sont tournés vers l'utilisation de stent en nitinol afin de potentiellement de réduire le traumatisme appliqué sur le péricarde.

Dans un premier temps, nous avons tout d'abord tenté de déterminer l'impact du sertissage des valves auto-expansible sur les propriétés mécanique du péricarde porcine. Afin d'analyser le comportement du péricarde nous avons modifié la chambre de pression afin de pouvoir déterminer l'élastance du tissu. Dans un second temps, nous avons cherché à savoir si le sertissage des bioprothèses auto-expansible en péricarde porcine pouvait entraîner une augmentation de la calcification du péricarde porcine. Pour cela, nous avons utilisé un modèle in-vivo consistant à implanter les tissus péricardiques dans les muscles paravertébraux de lapins New-Zealand. La cinétique de calcification des tissus implantés a été analysée par ICP-OES permettant de doser la concentration tissulaire de calcium, mais également par micro-CT qui permet d'avoir une estimation de la minéralisation des échantillons.

Les résultats de cette étude montrent que le sertissage des valves auto-expansible n'induit aucune altération de l'élastance ainsi qu'aucune augmentation de la calcification du péricarde porcine. Ces résultats suggèrent que le sertissage de ces bioprothèses n'a pas de conséquence immédiate sur le péricarde porcine.

Study of leaflets elasticity and
calcification following crimping of
porcine pericardium self-expandable
prostheses

Study of leaflets elasticity and calcification following crimping of porcine pericardium self-expandable prostheses

Channing Convelbo, PhD²; Morad Bensidhoum, PhD²; Hanane El-Hafci, BSc²; Rachid Zegdi, MD, PhD^{1,3}

Affiliations:

- 1) Université Paris Descartes, Paris V, France
- 2) CNRS UMR 7052 Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) - Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris
- 3) AP-HP, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France ; Service de Chirurgie

Corresponding author : Channing Convelbo

Laboratoire de Bioingénierie et Bioimagerie Ostéo-Articulaire (B2OA) ; 10 Avenue de Verdun, 75010 Paris.

E-mail address: c.convelbo@gmail.com

Telephone: +33(0)1 57 27 85 70

Fax: +33(0)1 57 27 85 71

Key words: Porcine pericardium; Calcification; Crimping; Mechanical testing; Elastance; TAVI

ABSTRACT

Objective: The main goal of the present study was to determine whether the crimping of porcine pericardium self-expandable prostheses was responsible for an alteration of its mechanical properties or increased calcification.

Methods: Self-expandable prostheses with porcine pericardial leaflets were used. Crimped prostheses were compared to control non-crimped prostheses. Following a 15-min period of crimping (16F), prostheses were deployed and their leaflets were removed. Using a pressure chamber, leaflets elastance was measured. Pericardial patches were also implanted intramuscularly in rabbits. Patches were explanted at different time-points up to 60 days. Tissue calcium content was determined using micro-CT scanning and ICP-AES calcium concentration analysis. Data were expressed as median (interquartile range).

Results: Prostheses crimping did not alter significantly any of the studied elastances. The elastance E1 was: 24.5 (15.0 – 37.2) mmHg/mL (after prostheses crimping) vs. 19.5 (6.7–33.7) mmHg/mL (before prostheses crimping), ($p=0.118$). The elastance E2 was: 75.0 (73.5–76.5) mmHg/mL (after prostheses crimping) vs. 73.0 (71.5 – 76.5) mmHg/mL (before prostheses crimping) ($p=0.325$). Likewise, post-implantation tissue calcium content did not differ between crimped and non-crimped prostheses: 181.0 (35.0 – 295.0) $\mu\text{g}/\text{mg}$ vs. 164.0 (125.0 – 184.0) $\mu\text{g}/\text{mg}$ at 60 days ($p=1.0$).

Conclusion: Crimping of porcine leaflets self-expandable prostheses (16Fr) was not responsible for alteration of pericardium elastance or increased in vivo calcification.

Key words: Self-expandable; Crimping; Elastance; Calcification; Porcine pericardium; TAVI

INTRODUCTION

Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) is increasingly used in patients with severe aortic stenosis (1). The two most often implanted percutaneous bioprostheses are the bovine pericardium balloon-expandable SAPIEN-3 and the porcine pericardium self-expandable CoreValve prosthesis (2). Despite good medium-term (5 years) results, there is no data regarding long-term (>10 years) durability of such bioprostheses (3-7).

Several studies have reported pericardial injury following crimping and deployment of these prostheses. All published studies were performed using bovine leaflets self- or balloon expandable prostheses (8, 9). In a recent study, our group has recently described occurrence of collagen fibers alteration after deployment of porcine pericardium self-expandable prostheses (submitted/accepted).

Concerns have been raised regarding a potential negative impact of prosthesis crimping on valve durability (10). Data, however, are scarce and discordant. Kiefer et coll. did not observe any increase in calcium tissue content after subcutaneous implantation in rats of pericardial patches obtained from crimped Sapien prostheses (11). Recently, in an ex vivo study, Sinha and coll. reported the presence of spots of calcification following crimping (14F) of bovine pericardium self-expandable prostheses (12). No published data are available regarding the risk of calcification of porcine leaflets self- or balloon expandable prostheses.

The main goal of this study was, therefore, to determine the impact of porcine pericardium self-expandable prostheses crimping on the in vivo calcification of their pericardial leaflets. The acute effect of prosthesis crimping on leaflet elasticity was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Samples:

Samples of porcine pericardium were purchased from a manufacturer (Neovasc, British Columbia, Canada). The pericardial samples were delivered in a 0.625% glutaraldehyde solution. The rough (or fibrous) and smooth (or serous) faces of the pericardial tissue were visually distinguished.

Valved-stent construction:

Two types of prostheses were used. First, for in-vitro leaflets elastance determination, four homemade prostheses were constructed using squared (25x25 mm) pericardial patches mounted onto a nitinol laser cut self-expandable stent (Cormove, Bornel, France).

Second, for in-vivo pericardial calcification analysis, seven prostheses were constructed using porcine pericardial semilunar leaflets mounted onto a nitinol laser cut self-expandable stent (Cormove, Bornel, France). These bioprostheses carried a polyester cuff between the pericardium and the nitinol frame.

Anticalcification treatment:

Pericardial sheets or leaflets were processed with the same anticalcification solution. This treatment consisted of formaldehyde, ethanol and tween-80.

Methods

Valved-stents crimping:

The self-expandable prostheses were progressively crimped and transferred into a 5.4mm (16F) internal diameter metallic tube. The prostheses were left compressed for 15 minutes and were regularly flushed with saline. Prosthesis expansion was achieved by pushing the prostheses out of the tube with a specific tappet.

In-vitro

Elastance determination:

After prostheses crimping, squared leaflets were removed and placed within the pressure chamber for elastance determination. Briefly, a cylindrical pressure chamber was filled with saline (Figure 1). Pericardial patches were placed between two ‘pistons’ with the fibrous surface always directed outside the chamber. The superior and inferior ‘pistons’ had a central coaxial orifice of 21.5-mm diameter. To avoid fluid filtration, a thin impermeable latex membrane (derived from the distal part of a condom-Durex (Reckitt Benckiser, United Kingdom) was interposed between the serous surface of the pericardial patch on one side and the reservoir of saline on the other side. The chamber was connected by a three-way cock valve to a rotating syringe filled with the same fluid as in the pressure chamber. The three-way cock valve was also connected to a mercurial manometer to measure the pressure within the chamber. To determine the pericardium “elastance”, the pressure within the chamber was recorded 5 seconds after each injection of 1mL of saline within the chamber. Five milliliters of saline were used in each experiment. The slope of the curve of the relation between the increase in the chamber pressure and the increase in the chamber volume was considered as reflecting the “elastance” of the pericardium. Two elastances were determined. E1 was

measured at the initial part of the curve (between 0-2 mL of injected fluid) whereas E2 was measured at the linear part of the curve (between 3-4 mL of injected fluid) (Figure 2). The pericardial elastance was expressed in mmHg/mL.

In-vivo

Rabbit intramuscular implantation:

For calcification analysis, two discs per leaflets were cut from prostheses whether or not they have been previously crimped. Tissue cutting was performed using a sterile 6-mm biopsy punch. The tissue samples were rinsed in a 0.9% saline solution prior implantation.

The rabbit intramuscular model was used for in vivo calcification analysis (13). The animals studies were approved in advance by the institutional animal care and use committee, and all studies were performed in an accredited facility. Eight New Zealand white rabbits aged between six and eight weeks were implanted with eight discs each. Each rabbit was implanted with leaflets samples from the crimped prostheses and from the non-crimped porcine pericardial discs (four of each type). The implantation site for each disc was randomized. A total of 32 discs per group was implanted.

Implantation was performed under general anesthesia by intramuscular injection of ketamine/xylazine (0.6 ml/kg). Anesthesia was maintained with isoflurane (2%) through a mask. An incision was made through the skin and into the latissimus dorsi muscle. The tissue discs were carefully inserted between the muscle layers.

Two rabbits were humanly euthanized at each of the following endpoints: day 15, 30, 45 and 60 ± 1 day. The samples were carefully retrieved from the muscle layers. The explanted tissues were then placed in 10% formalin prior further analysis.

Micro CT-scan analysis:

The pericardial samples were analyzed using a micro CT-scanner Skyscan 1172 (Bruker, Kontich, Belgium) immediately after tissue retrieval. Each tissue samples was sandwiched between two polystyrene frames. The ensemble was inserted into a cylindrical tube to maintain sample position during the process. The serosal surface of the pericardium was facing the micro CT camera at the beginning of the analysis.

All scans were performed at 40kV voltage, 100 μ A current without filter and a rotation step of 0.6°. The images were recorded with a pixel size of 6.7 μ m. After scanning, the results were reconstructed using NRecon software (Bruker, Kontich, Belgium).

A mouse tibia bone was also analyzed using the same parameters. The mouse bone was used as a reference to determine the mineral density for each sample. The tissular mineral density was defined as the ratio of the bone volume over the tissue volume for each sample and expressed as percentage.

Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) quantification:

After micro-CT analysis, the samples were oven dried overnight at 110°C to constant weight, then microwave digested in nitric acid after being weighed. The tissular calcium content was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy ICP-AES (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) in an external laboratory (Crealins, Villeurbanne, FRANCE). The tissular calcium content was expressed μ g/mg of dried tissue.

Statistical analysis:

Quantitative variables were expressed as mean or median (interquartile range). Comparisons between variables were performed using paired or unpaired Wilcoxon test or Fisher exact tests when appropriate. Statistical significance was defined as a p-value <0.05.

Experimental protocol

Experiment 1

The purpose of this experiment was to determine the impact of prosthesis crimping on the elastance of their pericardial leaflets.

Four prostheses (n=12 squared leaflets) were used. For each leaflet, elastance E1 and E2 were determined before and after prostheses crimping

Experiment 2

The aim of this study was to evaluate the impact of prosthesis crimping on porcine pericardium leaflets calcification in an in-vivo animal model.

The pericardial discs from crimped (CP; n=32) and non-crimped prostheses (NCP; n=32) were intramuscularly implanted into New Zealand White rabbit up to 60 days. Two rabbits were humanly euthanized at each of the following endpoints: day 15, 30, 45 and 60 ± 1 day.

The samples were explanted at 15, 30, 45 and 60 days after implantation and rinsed using 0.9% saline. The discs were, then, analyzed for mineralization using micro CT-scan and for calcium concentration using ICP-AES.

RESULTS

Experiment 1

There was no difference between control and crimped leaflets regarding the pressure chamber at each level of injected volume of saline (Figure 2).

Elastance E1 did not differ significantly between the two groups: 24.5 (15.0 – 37.2) mmHg/mL (after prostheses crimping) vs. 19.5 (6.7– 33.7) mmHg/mL (before prostheses crimping), (p=0.118).

Elastance E2 also did not differ significantly between the two groups: 75.0 (73.5– 76.5) mmHg/mL (after prostheses crimping) vs. 73.0 (71.5 – 76.5) mmHg/mL (before prostheses crimping) (p=0.325).

Experiment 2

After 60 days of implantation, the tissular calcium content did not differ between crimped and non-crimped prostheses: 181.0 (35.0 – 295.0) µg/mg vs. 164.0 (125.0 – 184.0) µg/mg, (p=1.0). The mean tissular calcium content was not significantly different between groups at each time-point (Figure 3).

After 60 days, mean tissular mineral density did not differ between discs from crimped or non-crimped prostheses: 0.12 % (0.06 – 0.17) vs. 0.12 % (0.06 – 0.15), (p=1.0). There was also no statistical difference in the mean tissular mineral density between discs from crimped and non-crimped prostheses at each time-point (Figure 4).

DISCUSSIONS

The aim of the present study was to determine the consequences of porcine pericardium self-expandable prostheses crimping. Several studies have reported leaflets structural alteration after prosthesis crimping and deployment of self- or balloon-expandable bovine leaflets prostheses (8, 10, 14). These alterations primarily consisted in collagen fibers compression, fractures or dissociation. Our group has demonstrated the occurrence of pericardial injury following crimping of porcine pericardium self-expandable prostheses. These alterations were less severe than that observed with bovine pericardium balloon-expandable prostheses (personal communication).

Very few experimental studies have evaluated the impact of transcatheter prosthesis crimping on pericardial leaflets mechanical properties (15, 16). Most of these studies are based on uniaxial or biaxial tensile testing. After self-expandable prostheses crimping (10F), Khoffi & Heim, observed a 50% decreased of the ultimate tensile strength of bovine pericardium using uniaxial tensile testing (15).

With uni or multi-axial testing, tissue stress is generated along a direction imposed by the experimenter. Furthermore, the pericardial tissue remains in the same plane while being elongated. This is not the case in vivo since leaflets elongation is generated by arterial or intra-cardiac pressure and occurs in a 3D direction. These are the reasons that have conducted our team to develop a new test for evaluation of tissue elasticity.

In our set-up, tissue elongation is pressure-driven and occurs in a 3D direction. Tissue elasticity, however, is indirectly determined by measurement of the elastance of the complex syringe-pericardial patch. Owing to the rigidity of the syringe, the relation between pressure and volume within the pressure chamber is, therefore, only dependent on patch displacement through tissue elongation. In the present work, prosthesis crimping (16F) did not alter porcine

pericardial leaflet elastance. This does not mean that tissue injury did not occur following prosthesis crimping. In fact, tissue injury has already been shown to occur in the same experimental model (personal communication). It only suggests that the extracellular matrix is not sufficiently altered to induce increased tissue elasticity.

Leaflets calcification has been frequently described in pericardial bioprostheses explanted for late structural deterioration (17). Numerous studies have been performed in order to better understand tissue calcification of implanted bioprostheses (18, 19). Increased stress on leaflets is associated to an increased risk of calcification (20, 21). This phenomenon seems to be related to stress-induced collagen fibers alteration (20, 21). Jorge-Herrero and coll, have reported higher calcium concentration in pericardial leaflets portions sustaining maximal stresses (22). Authors have suggested that ruptured collagen fibers might serve as nucleation site for calcification (20, 21).

Collagen fibers alteration has been demonstrated to occur following prosthesis crimping (8, 10). It has been suggested that this early tissue injury might have a deleterious effect on leaflets calcification (10). Data available in the literature are scarce and conflicting. Kiefer et coll. did not observe any increase in calcium tissue content after subcutaneous implantation in rats of pericardial patches obtained from crimped Sapien prostheses (11). Recently, in an ex vivo study, Sinha and coll. reported the presence of spots of calcification following crimping (14F) of bovine pericardium self-expandable prostheses (12). Both studies used bovine pericardium and different experiment tools. Our study did not demonstrate an increased rate of porcine pericardium leaflets calcification following prosthesis crimping at 16F.

Several authors have reported that crimping-induced tissue injury of bovine pericardium had a multifocal distribution. We have recently proved that it was also the case with porcine pericardium (personal communication). We have also shown that crimping related tissue

injury was less severe with porcine leaflets self-expandable prostheses in comparison to bovine leaflets balloon-expandable prostheses (personal communication). A minor tissue injury, as suggested by the unaltered tissue elasticity in our study, might explain the absence of accelerated tissue calcification from crimped prostheses.

Porcine pericardium self-expandable prostheses such as the CoreValve are now widely used. Absence of accelerated calcification following porcine pericardium self-expandable prosthesis crimping is, therefore, reassuring. The impact of more severe injury (potentially induced by crimping at a lower profile: 10-14Fr) should, however, be investigated.

FIGURES

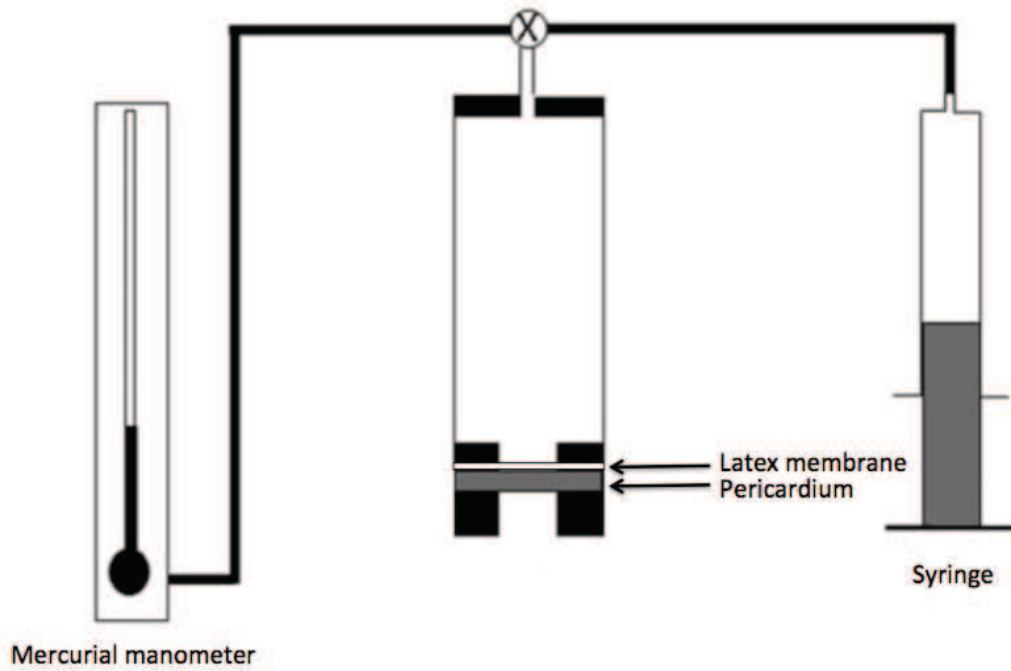


Figure 1: Schematic diagram showing the pressure chamber (filled with saline —middle) used to determine the elance of the pericardial sheets. The chamber was connected to an inflation syringe (right) and a manometer (left).

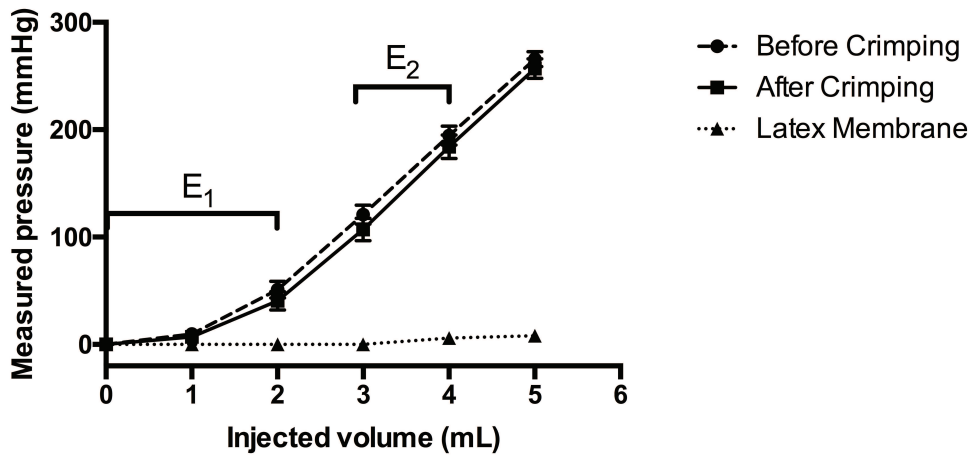


Figure 2: Curves representing the relation between the pressure and of the injected volume of saline within the pressure chamber. The elastances E1 and E2 were determined at the shown periods.

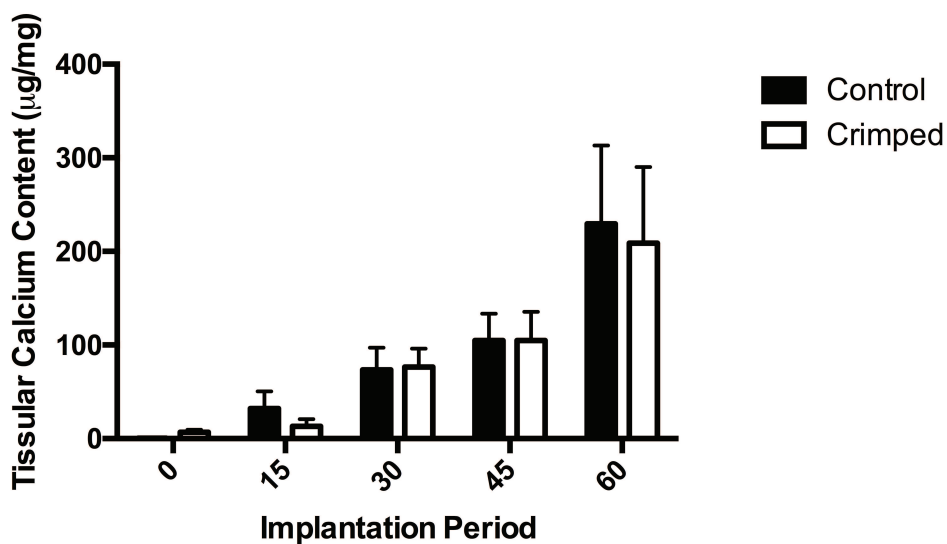
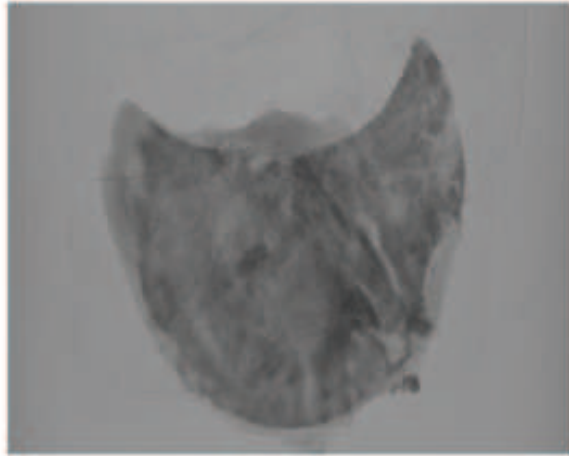


Figure 3: Histograms representing the evolution of the mean calcium content in leaflets from crimped and non-crimped prostheses. There was no significant difference between groups at each time-point.

Control



Crimped

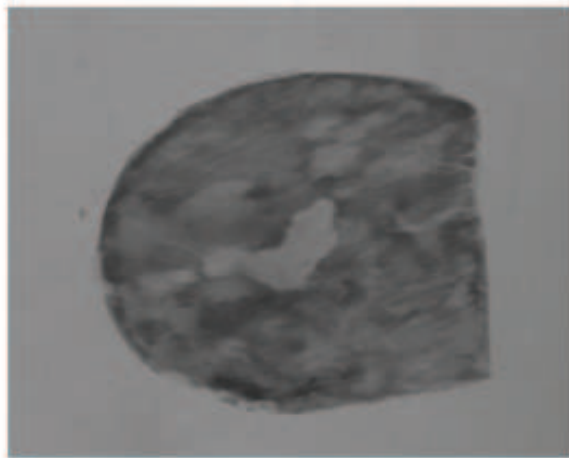


Figure 4: Micro-CT scanner images from control and crimped pericardial disc after 60 days of implantation.

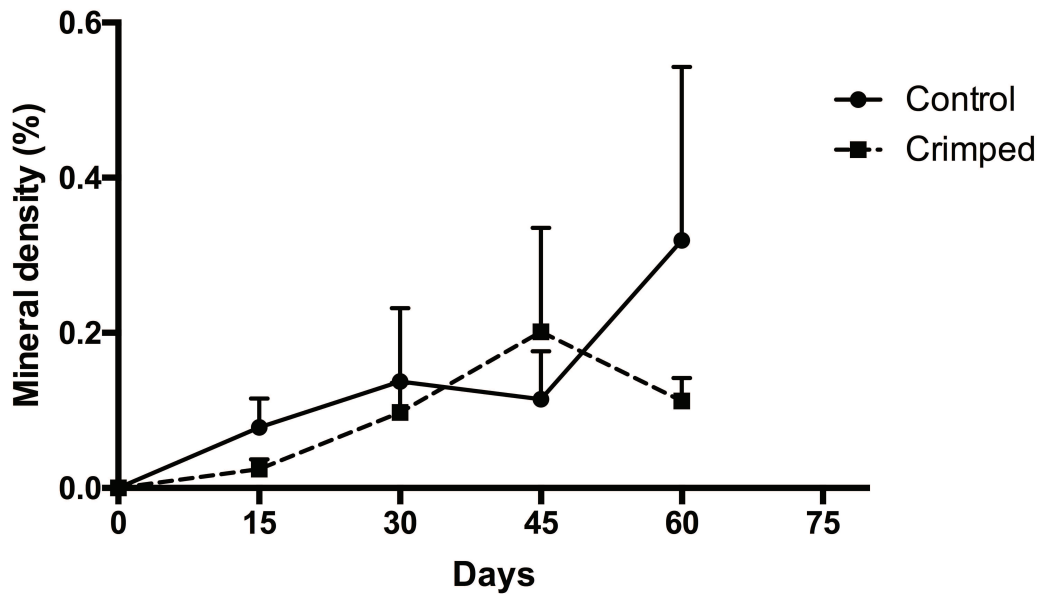


Figure 5: Curves representing the evolution of the mean mineral density in leaflets from crimped and non-crimped prostheses. No significant difference between groups was observed at each time-point.

REFERENCES

1. Eggebrecht H, Mehta RH. Transcatheter aortic valve implantation (TAVI) in Germany 2008-2014: on its way to standard therapy for aortic valve stenosis in the elderly? *EuroIntervention* : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology. 2015;11(5).
2. Kilic T, Yilmaz I. Transcatheter aortic valve implantation: a revolution in the therapy of elderly and high-risk patients with severe aortic stenosis. *J Geriatr Cardiol*. 2017;14(3):204-17.
3. Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM, et al. 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet*. 2015;385(9986):2477-84.
4. Barbanti M, Petronio AS, Etti F, Latib A, Bedogni F, De Marco F, et al. 5-Year Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation With CoreValve Prosthesis. *JACC Cardiovascular interventions*. 2015;8(8):1084-91.
5. Toggweiler S, Humphries KH, Lee M, Binder RK, Moss RR, Freeman M, et al. 5-year outcome after transcatheter aortic valve implantation. *J Am Coll Cardiol*. 2013;61(4):413-9.
6. Webb J, Gerosa G, Lefevre T, Leipsic J, Spence M, Thomas M, et al. Multicenter evaluation of a next-generation balloon-expandable transcatheter aortic valve. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(21):2235-43.

7. Dvir D, Eltchaninoff H, Ye J, Kan A, Durand E, Bizios A, et al. First look at long-term durability of transcatheter heart valves: Assessment of valve function up to 10-years after implantation. EuroPCR 2016; Palais des Congrès, Paris2016.
8. Alavi SH, Groves EM, Kheradvar A. The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets. *The Annals of thoracic surgery*. 2014;97(4):1260-6.
9. Amahzoune B, Bruneval P, Allam B, Lafont A, Fabiani JN, Zegdi R. Traumatic leaflet injury during the use of percutaneous valves: a comparative study of balloon- and self-expandable valved stents. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2013;43(3):488-93.
10. Zegdi R, Bruneval P, Blanchard D, Fabiani JN. Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2011;40(1):257-9.
11. Kiefer P, Gruenwald F, Kempfert J, Aupperle H, Seeburger J, Mohr FW, et al. Crimping may affect the durability of transcatheter valves: an experimental analysis. *The Annals of thoracic surgery*. 2011;92(1):155-60.
12. Sinha A, Kheradvar A. Leaflet Calcification and Matrix Damage Due to Transcatheter Heart Valve Crimping. *Circulation*. 2015;132(Suppl 3):1.
13. Wright GA, Faught JM, Olin JM. Assessing anticalcification treatments in bioprosthetic tissue by using the New Zealand rabbit intramuscular model. *Comp Med*. 2009;59(3):266-71.
14. Convelbo C, Guetat P, Cambillau M, Allam B, Bruneval P, Lafont A, et al. Crimping and deployment of balloon-expandable valved stents are responsible for the increase in the

hydraulic conductance of leaflets. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2013;44(6):1045-50.

15. Khoffi F, Heim F. Mechanical degradation of biological heart valve tissue induced by low diameter crimping: an early assessment. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2015;44:71-5.

16. Munnelly AE, Cochrane L, Leong J, Vyavahare NR. Porcine vena cava as an alternative to bovine pericardium in bioprosthetic percutaneous heart valves. *Biomaterials*. 2012;33(1):1-8.

17. Hilbert SL, Ferrans VJ, McAllister HA, Cooley DA. Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprostheses. Histologic and ultrastructural studies. *Am J Pathol*. 1992;140(5):1195-204.

18. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *The Annals of thoracic surgery*. 2005;79(3):1072-80.

19. Tod TJ, Dove JS. The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification. *J Mater Sci Mater Med*. 2016;27(1):8.

20. Thubrikar MJ, Deck JD, Aouad J, Nolan SP. Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 1983;86(1):115-25.

21. Deiwick M, Glasmacher B, Tjan DT, Reul H, von Bally G, Scheld HH. Holographic interferometry and in vitro calcification: comparing pericardial versus porcine bioprostheses. *The Journal of heart valve disease*. 1998;7(4):419-27.

22. Jorge-Herrero E, Fernandez P, Escudero C, de la Torre N, Zurita MGPJM, Castillo-Olivares JL. Influence of stress on calcification of delipidated bovine pericardial tissue employed in construction of cardiac valves. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(3):411-5.

DISCUSSION

Nouveaux outils d'étude du péricarde

Le péricarde peut être considéré d'un point de vue physique comme une membrane. Les membranes sont habituellement caractérisées par leurs coefficients de perméabilité. Nous avons pu montrer dans un travail antérieur qu'il était possible de déterminer à l'aide d'une chambre de pression le coefficient de perméabilité (Convelbo *et al.* 2013). Nous avons observé que ce coefficient ne dépendait pas de la pression trans-péricardique ni de son épaisseur (pour le péricarde bovin). La mesure est reproductible mais il existe des variations importantes de cette perméabilité en fonction de l'origine du péricarde. Ainsi, le péricarde bovin étudié dans cette thèse avait un coefficient de perméabilité nettement inférieur à celui provenant des patchs péricardiques commercialisés par la société Edwards (données personnelles). Il était également beaucoup plus faible que le péricarde obtenu d'un abattoir. La mise au point de la mesure de la perméabilité hydraulique globale, permet de l'envisager comme un outil d'évaluation du traumatisme péricardique. Cependant les données histologiques rapportées dans la littérature suggéraient des lésions multifocales après sertissage. Il nous fallait donc disposer d'un outil capable d'évaluer la perméabilité locale du péricarde.

Pour cela, nous avons fait l'hypothèse que des différences locales de perméabilité membranaire pouvaient être mises en évidence grâce à un colorant contenu dans la solution utilisée dans la chambre de pression. En effet, la fixation tissulaire d'un colorant dépend non seulement de son affinité tissulaire mais aussi de son débit transmembranaire. Notre choix s'est porté sur le bleu Evans en raison de son affinité connue pour de nombreuses protéines

tissulaires. Celui-ci est en effet capable de se lier de manière covalente à de nombreuses molécules dont le collagène et l'élastine (Heinle & Lindner 1984). Nous avons pu montrer que les zones fortement colorées avaient effectivement une perméabilité membranaire accrue par rapport aux zones moins colorées. Nous avons pu ainsi confirmer notre hypothèse de départ. Il devient donc possible d'étudier les conséquences du sertissage sur la perméabilité membranaire locale du péricarde.

Il a été récemment rapporté des lésions d'insudation plasmatique sur une prothèse SAPIEN explanté peu de temps après son implantation chez l'homme (Zegdi *et al.* 2011). Partant de cette constatation, nous avons voulu savoir si la perméabilité membranaire aux macromolécules était altérée après sertissage des prothèses. Il nous a fallu mettre au point un modèle d'insudation plasmatique. Celui-ci a été facile à mettre en œuvre. Cependant, la mise en évidence d'une insudation plasmatique passait nécessairement par une évaluation histologique. L'utilisation d'un marqueur fixé à une macromolécule plasmatique pourrait permettre d'évaluer l'insudation plasmatique à la fois globalement et localement sans avoir recours à une étude histologique.

De nombreuses études ont évalué le comportement mécanique du péricarde (Aguari *et al.* 2016). Ainsi, il est bien connu que celui-ci est un matériau viscoélastique anisotrope. Cependant, une étude approfondie du comportement mécanique nécessiterait l'utilisation d'une traction multiaxiale. Ce mode d'évaluation ne permet pas d'apprécier le comportement d'un feuillet d'une bioprothèse. En effet, l'allongement du matériau *in-vivo* est engendré par les variations de la pression trans-prothétique. L'allongement qui en résulte dépend alors du niveau de pression, du design de la prothèse et des caractéristiques mécaniques du feuillet.

Nous voulions disposer d'une méthode d'évaluation mécanique du feuillet engendré par une pression transmembranaire. Cette évaluation a été facilement mise au point, il fallait pour cela

disposer d'une membrane imperméable et très compliant. Cette évaluation « globale » du comportement mécanique du péricarde peut être complété par une étude locale. Il faudrait pour cela coupler le test à une mesure des variations locales de la surface du péricarde en tension. Ceci peut être effectué par différentes méthodes optiques (interférométrie ou photogrammétrie) capable de mesurer le déplacement de repères visuels présents sur le péricarde.

Comparaison entre le péricarde bovin et porcine

Les études comparant les deux types de péricarde sont relativement peu nombreuses. Ainsi il est bien connu que le péricarde porcine est moins épais et aussi résistant que le péricarde bovin (Naimark *et al.* 1992). La comparaison de la perméabilité membranaire pour ces deux tissus n'a jamais été effectuée auparavant.

A l'aide des outils développés par notre équipe, nous avons pu tout d'abord observer une perméabilité membranaire globale 5-fois plus élevée pour le péricarde porcine. Nous avons également pu constater sur ce dernier une coloration très hétérogène au bleu Evans suggérant des variations importantes de la perméabilité membranaire locale. Le péricarde bovin utilisé dans ce travail présentait une coloration homogène. Cependant, des différences entre les sources de péricardes ont pu être observées tout comme pour la perméabilité globale (données personnelles).

Nous avons eu la surprise de constater une insudation plasmatique marquée pour le péricarde porcine. Cette insudation n'a pas été observée avec le péricarde bovin. L'insudation plasmatique du péricarde est une « lésion » observée dans les bioprothèses détériorées explantées (Hilbert *et al.* 1992, Zegdi *et al.* 2011). Cette lésion était co-localisée avec des zones de calcifications tissulaires. En raison d'une perméabilité plasmatique élevée, la constatation d'une insudation plasmatique dans des bioprothèses faites de péricarde porcine ne

peut être considérée comme une lésion pathologique. L'insudation plasmatique n'a pu être observée avec le péricarde bovin. Cependant, les conditions expérimentales étaient possiblement inadaptées (temps d'exposition court :10min) pour permettre d'identifier ce phénomène.

A l'aide de l'outil développé par notre équipe, nous avons pu montrer que le péricarde porcine était plus « compliant » que le péricarde bovin lorsqu'il est étiré simultanément dans toutes les directions de l'espace. Ceci suggère que le péricarde porcine est moins rigide que le péricarde bovin. Nous confirmons ainsi les données observées par Gauvin *et al* avec une autre méthode (Gauvin *et al.* 2013). A l'aide d'une variante de ce test, une détermination de la pression (ou du volume) de rupture du péricarde est envisageable. Il ne nous a pas été possible de déterminer la pression de rupture pour les péricardes étudiés.

L'ensemble des données met en évidence un comportement très différent entre les deux types de péricarde. Les différences observées sont vraisemblablement le reflet de différences dans la composition ou l'organisation spatiale de la matrice extracellulaire des péricardes. Il a été montré que le contenu en collagène de type I était notamment plus élevé dans le péricarde bovin (Schoen *et al.* 1986, Braga-Vilela *et al.* 2008). Une étude de la structure du péricarde (par Small Angle Light Scattering) pourrait confirmer une répartition différente du collagène entre les deux types de péricarde (Hiester & Sacks 1998a). Elle pourrait d'une part confirmer l'existence de différences et d'autre part mieux comprendre la structure des zones hyperperméables du tissu.

Confirmation des altérations induites par le sertissage

Comme déjà rapportées dans la littérature, nous avons également observé des lésions du péricarde en histologie (Zegdi *et al.* 2011, Amahzoune *et al.* 2013). Celles-ci consistent en des zones de rupture ou de compression des faisceaux de collagène. Toutefois, ces lésions sont difficilement quantifiables. La quantification histologique des lésions est difficile en raison, d'une part, d'une distribution hétérogène au sein du tissu et, d'autre part, de leur complexité. En effet, certaines lésions observées de dissociations peuvent se présenter sous la forme d'une zone principale avec de multiples refends (Amahzoune *et al.* 2013). Certaines fractures, également, présentent de multiples débris. Dans notre travail, plusieurs tentatives basées sur l'analyse digitale des photos ont été infructueuses. Ainsi, il semble peu probable qu'une classification histologique basée sur la nature des lésions puisse rendre compte de la sévérité de celles-ci. Une classification basée sur la répartition des lésions pourrait être envisagée. Cependant, le caractère multifocal des lésions rendrait difficile une telle étude.

Nous avons pu montrer une augmentation de la perméabilité hydraulique des feuillets péricardiques après leur altération locale (écrasement tissulaire). Ces données confirment donc l'intérêt de la mesure de la perméabilité globale comme marqueur du traumatisme tissulaire.

Le design de l'étude 2 avait un double objectif. Le premier était d'évaluer le rôle du sertissage et du déploiement sur la survenue de lésions pour chaque type de prothèse. Le second, était de comparer l'importance des lésions entre les types de prothèses. La constatation d'anomalies de la perméabilité membranaire (hydraulique ou plasmatique) au sein de prothèses de même nature (soit bovines soit porcines) permet d'attribuer celles-ci à un traumatisme du péricarde lors du sertissage ou du déploiement des prothèses.

Une augmentation de la perméabilité hydraulique globale n'a été observée qu'avec les prothèses dont les feuillets étaient constituées de péricarde bovin. Ces résultats confirment ceux obtenus dans une étude antérieure (Convelbo *et al.* 2013). Nous avons également observé une corrélation positive entre le coefficient de perméabilité globale et le degré de sertissage de prothèse à stent rigide comportant des feuillets de péricarde bovin (données personnelles). Cette relation confirme le caractère traumatique du sertissage et du déploiement par ballon et souligne l'importance du degré de sertissage sur l'apparition de lésion.

Après traumatisme local, nous avons pu montrer un marquage de la zone traumatisée après exposition du péricarde au bleu Evans. Sur des prothèses serties, nous avons observé l'apparition de zones fortement colorées lors de l'étude de la perméabilité locale du péricarde bovin. Par ailleurs, les zones fortement colorées étaient significativement plus importantes après sertissage des prothèses avec péricarde porcine. En raison du design de l'étude 2, nous pouvons affirmer que ces anomalies reflètent l'existence d'un traumatisme tissulaire. La répartition « aléatoire » des lésions péricardiques confirme le caractère multifocal des lésions, déjà décrit en histologie. Nous n'avons pas encore évalué l'impact du degré de sertissage des bioprothèses sur la densité des zones hyper-fixantes (au bleu Evans) du péricarde.

Nous avons démontré pour la première fois une augmentation de l'insudation plasmatique après sertissage des prothèses à stent rigide ou auto-expansible. Cette augmentation permet d'expliquer l'observation d'une insudation plasmatique quelques heures après l'implantation d'une valve SAPIEN chez l'homme (Zegdi *et al.* 2011).

L'ensemble de nos données concernant le péricarde des prothèses ayant été serties, ne peut être expliqué que par l'existence d'une altération de la matrice extracellulaire du péricarde, principal constituant de celui-ci et composée majoritairement de collagène. Dans notre étude, l'absence d'une altération du comportement mécanique du péricarde après sertissage, n'exclut

pas l'altération structurale du péricarde. Elle suggère que les lésions observées (notamment en histologie) n'ont pas de conséquences sur la mesure de l'élasticité tissulaire évaluée selon notre protocole. Si le comportement mécanique du péricarde semble préservé, nous ne pouvons exclure un effet délétère du sertissage sur la fatigue du péricarde. Cependant, les études *in-vitro* rapportées (mais non publiées) par les fabricants de prothèses ne semblent pas faire état d'une fatigue prématurée.

Conséquence du sertissage sur la calcification

Il existe très peu de données relatives aux effets délétères de l'altération de la structure péricardique sur sa calcification *in-vivo*. Dans un modèle *in-vitro* de fatigue tissulaire, Thubrikar a montré que les zones altérées du péricarde (situées près des commissures) calcifiaient plus que les zones non-altérées situées près de la base d'implantation valvulaire (Thubrikar *et al.* 1983). Récemment Sinha & Kheradvar ont montré dans un modèle de calcification *in-vitro* que le péricarde bovin provenant de prothèses serties calcifiait plus que le péricarde témoin (Sinha & Kheradvar 2015). Il a été suggéré que le traumatisme valvulaire lié au sertissage pouvait exposer des sites ayant une affinité marquée pour le calcium (Thubrikar *et al.* 1983, Deiwick *et al.* 1998).

Dans notre travail, l'étude de la calcification du péricarde serti comparativement au péricarde témoin a été effectuée à l'aide de deux méthodes distinctes. D'une part, par le dosage chimique du contenu tissulaire en calcium par la méthode de l'inductively coupled plasma (ICP-AES) et la détermination de la minéralisation par micro-scanner. Ces deux méthodes quantifient deux aspects distincts de la calcification tissulaire et se complètent donc. Dans notre étude, nous avons observé que le péricarde porcine provenant de prothèses auto-expansibles serties (16F) ne calcifiait pas plus que le péricarde témoin dans un modèle classique de calcification *in-vivo* (implantation intramusculaire chez le lapin).

Nos résultats ne permettent pas d'exclure un rôle délétère du sertissage sur la calcification *in-vivo* du tissu. L'absence apparente d'une calcification exagérée du péricarde porcine serti pourrait être le reflet d'un traumatisme péricardique mineur. Une étude de la calcification du péricarde bovin provenant de prothèses serties n'a malheureusement pas pu être effectuée dans le laboratoire.

Une évaluation *in-vivo* chez le gros animal pourrait permettre de mieux apprécier l'effet du sertissage sur la calcification *in-vivo*. En effet, dans ce modèle, les feuillets serties pourraient se détériorer plus rapidement en raison d'une altération de leur structure qui augmenterait les contraintes auxquelles elles sont soumises. Ce modèle animal prendrait aussi en compte un éventuel effet pro-calcifiant de l'insudation plasmatique des feuillets, accrue après sertissage des prothèses. A ce jour, le rôle pro-calcifiant de l'insudation plasmatique (comme cela a été suggéré par Ishihara) n'a pas été encore rapporté (Ishihara *et al.* 1981a).

CONCLUSION

L'étude de la perméabilité membranaire hydraulique du péricarde, globale ou locale, a révélée des différences importantes de comportement entre le péricarde bovin et porcin. L'insudation plasmatique n'a été observée, dans les conditions expérimentales de l'étude, qu'avec le péricarde porcin. Ces données suggèrent des différences importantes dans la structure et/ou la composition de la matrice extracellulaire du péricarde. Ces différences pourraient également expliquer le caractère plus élastique du péricarde porcin comparativement au péricarde bovin.

Les outils développés ont permis de confirmer l'existence d'une altération du péricarde liée au sertissage des prothèses. Cette altération, passant vraisemblablement par une désorganisation ou une altération de la matrice péricardique, s'est traduite par une augmentation des perméabilités membranaires hydraulique (globale et locale) et de l'insudation plasmatique.

Il n'a pas été observé de calcification prématurée ou exagérée du péricarde porcin provenant de prothèses auto-expansibles serties (16F). Ceci est plutôt rassurant quant à l'utilisation des prothèses de type CoreValve chez l'homme. Cependant, des études complémentaires *in-vivo* chez l'animal seront nécessaires pour évaluer l'éventuel impact du degré de sertissage sur la calcification tissulaire.

REFERENCES

- 5840-3, I. (2013). Cardiovascular implants -- Cardiac valve prostheses -- Part 3: Heart valve substitutes implanted by transcatheter techniques. I. O. f. Standardization. **ISO 5840-3**: 105.
- Aguiari, P., M. Fiorese, L. Iop, G. Gerosa and A. Bagno (2016). "Mechanical testing of pericardium for manufacturing prosthetic heart valves." *Interact Cardiovasc Thorac Surg* **22**(1): 72-84.
- Aikawa, E., P. Whittaker, M. Farber, K. Mendelson, R. F. Padera, M. Aikawa and F. J. Schoen (2006). "Human semilunar cardiac valve remodeling by activated cells from fetus to adult: implications for postnatal adaptation, pathology, and tissue engineering." *Circulation* **113**(10): 1344-1352.
- Alavi, S. H., E. M. Groves and A. Kheradvar (2014). "The effects of transcatheter valve crimping on pericardial leaflets." *Ann Thorac Surg* **97**(4): 1260-1266.
- Amahzoune, B., P. Bruneval, B. Allam, A. Lafont, J. N. Fabiani and R. Zegdi (2013). "Traumatic leaflet injury during the use of percutaneous valves: a comparative study of balloon- and self-expandable valved stents." *Eur J Cardiothorac Surg* **43**(3): 488-493.
- Andersen, H. R., L. L. Knudsen and J. M. Hasenkam (1992). "Transluminal implantation of artificial heart valves. Description of a new expandable aortic valve and initial results with implantation by catheter technique in closed chest pigs." *Eur Heart J* **13**(5): 704-708.
- Angelini, A., S. Y. Ho, R. H. Anderson, W. A. Devine, J. R. Zuberbuhler, A. E. Becker and M. J. Davies (1989). "The morphology of the normal aortic valve as compared with the aortic valve having two leaflets." *J Thorac Cardiovasc Surg* **98**(3): 362-367.
- Arbustini, E., M. Jones, R. D. Moses, E. E. Eidbo, R. J. Carroll and V. J. Ferrans (1984). "Modification by the Hancock T6 process of calcification of bioprosthetic cardiac valves implanted in sheep." *Am J Cardiol* **53**(9): 1388-1396.
- Ardans, J. A., A. P. Economou, J. M. Martinson, Jr., M. Zhou and L. M. Wahl (2002). "Oxidized low-density and high-density lipoproteins regulate the production of matrix metalloproteinase-1 and -9 by activated monocytes." *J Leukoc Biol* **71**(6): 1012-1018.
- Balachandran, K., P. Sucosky, H. Jo and A. P. Yoganathan (2010). "Elevated cyclic stretch induces aortic valve calcification in a bone morphogenetic protein-dependent manner." *Am J Pathol* **177**(1): 49-57.
- Barbanti, M., A. S. Petronio, F. Etori, A. Latib, F. Bedogni, F. De Marco, A. Poli, C. Boschetti, M. De Carlo, C. Fiorina, A. Colombo, N. Brambilla, G. Bruschi, P. Martina, C. Pandolfi, C. Giannini, S. Curello, C. Sgroi, S. Gulino, M. Patane, Y. Ohno, C. Tamburino, G. F. Attizzani, S. Imme, A. Gentili and C. Tamburino (2015). "5-Year Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation With CoreValve Prosthesis." *JACC Cardiovasc Interv* **8**(8): 1084-1091.
- Barnhart, G. R., M. Jones, T. Ishihara, A. M. Chavez, D. M. Rose and V. J. Ferrans (1982). "Failure of porcine aortic and bovine pericardial prosthetic valves: an experimental investigation in young sheep." *Circulation* **66**(2 Pt 2): 1150-1153.
- Binet, J. P., A. Carpentier and J. Langlois (1966). "[Heterologous transplantation of the aortic valve]." *Langenbecks Arch Chir* **316**: 800-802.
- Bini, A., K. G. Mann, B. J. Kudryk and F. J. Schoen (1999). "Noncollagenous bone matrix proteins, calcification, and thrombosis in carotid artery atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(8): 1852-1861.
- Boskey, A. L., M. R. Goldberg and A. S. Posner (1979). "Effect of diphosphonates on hydroxyapatite formation induced by calcium-phospholipid-phosphate complexes." *Calcif Tissue Int* **27**(1): 83-88.
- Bothner, C., J. Seeger, W. Rottbauer and J. Wöhrle (2017). "Fast Valve Degeneration after Transcatheter Aortic Valve Replacement in a Hemodialysis Patient." *Journal of Cardiology and Clinical Research* **5**(3): 4.

Boughner, D. R., M. Haldenby, A. J. Hui, J. Dunmore-Buyze, E. A. Talman and W. K. Wan (2000). "The pericardial bioprosthesis: altered tissue shear properties following glutaraldehyde fixation." J Heart Valve Dis **9**(6): 752-760.

Bourget, J. M., R. Zegdi, J. Lin, P. Wawryko, Y. Merhi, C. Convelbo, J. Mao, Y. Fu, T. Xu, N. O. Merkel, L. Wang, L. Germain, Z. Zhang and R. Guidoin (2016). "Correlation between structural changes and acute thrombogenicity in transcatheter pericardium valves after crimping and balloon deployment." Morphologie.

Braga-Vilela, A. S., E. R. Pimentel, S. Marangoni, M. H. Toyama and B. de Campos Vidal (2008). "Extracellular matrix of porcine pericardium: biochemistry and collagen architecture." J Membr Biol **221**(1): 15-25.

Braverman, A. C., H. Guven, M. A. Beardslee, M. Makan, A. M. Kates and M. R. Moon (2005). "The bicuspid aortic valve." Curr Probl Cardiol **30**(9): 470-522.

Broom, N. D. (1977). "The stress/strain and fatigue behaviour of glutaraldehyde preserved heart-valve tissue." J Biomech **10**(11/12): 707-724.

Capodanno, D., A. S. Petronio, B. Prendergast, H. Eltchaninoff, A. Vahanian, T. Modine, P. Lancellotti, L. Sondergaard, P. F. Ludman, C. Tamburino, N. Piazza, J. Hancock, J. Mehilli, R. A. Byrne, A. Baumbach, A. P. Kappetein, S. Windecker, J. Bax and M. Haude (2017). "Standardized definitions of structural deterioration and valve failure in assessing long-term durability of transcatheter and surgical aortic bioprosthetic valves: a consensus statement from the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI) endorsed by the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)." Eur J Cardiothorac Surg **52**(3): 408-417.

Carapetis, J. R., A. C. Steer, E. K. Mulholland and M. Weber (2005). "The global burden of group A streptococcal diseases." Lancet Infect Dis **5**(11): 685-694.

Carpentier, A. (2010). "Hemodynamic factors affecting the fate of valvular bioprosthesis." Circulation **121**(19): 2083-2084.

Carpentier, A. and S. Carpentier (2003). Methods for treating implantable biological tissues to mitigate the calcification thereof and bioprosthetic articles treated by such methods. USA, Edwards Lifesciences Corporation. **US 6,561,970 B1**.

Carpentier, A., A. Deloche, J. Relland, J. N. Fabiani, J. Forman, J. P. Camilleri, R. Soyer and C. Dubost (1974). "Six-year follow-up of glutaraldehyde-preserved heterografts. With particular reference to the treatment of congenital valve malformations." J Thorac Cardiovasc Surg **68**(5): 771-782.

Carpentier, A., A. Nashef, S. Carpentier, A. Ahmed and N. Goussef (1984). "Techniques for prevention of calcification of valvular bioprostheses." Circulation **70**(3 Pt 2): 1165-1168.

Carpentier, S. M., A. F. Carpentier, L. Chen, M. Shen, L. J. Quintero and T. H. Witzel (1995). "Calcium mitigation in bioprosthetic tissues by iron pretreatment: the challenge of iron leaching." Ann Thorac Surg **60**(2 Suppl): S332-338.

Carpentier, S. M., L. Chen, M. Shen, P. Fornes, B. Martinet, L. J. Quintero, T. H. Witzel and A. F. Carpentier (1998). "Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses." Ann Thorac Surg **66**(6 Suppl): S264-266.

Carpentier, S. M., M. Shen, L. Chen, C. M. Cunanan, B. Martinet and A. Carpentier (2001). "Biochemical properties of heat-treated valvular bioprostheses." Ann Thorac Surg **71**(5 Suppl): S410-412.

Chaikof, E. L. (2007). "The development of prosthetic heart valves--lessons in form and function." N Engl J Med **357**(14): 1368-1371.

Chambers, J. (2014). "Prosthetic heart valves." Int J Clin Pract **68**(10): 1227-1230.

Chen, J. H., C. Y. Yip, E. D. Sone and C. A. Simmons (2009). "Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential." Am J Pathol **174**(3): 1109-1119.

Chen, W., J. D. Kim, F. J. Schoen and R. J. Levy (1994). "Effect of 2-amino oleic acid exposure conditions on the inhibition of calcification of glutaraldehyde cross-linked porcine aortic valves." *J Biomed Mater Res* **28**(12): 1485-1495.

Cheung, D. T. and M. E. Nimni (1982). "Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde II. Reaction with monomeric and polymeric collagen." *Connect Tissue Res* **10**(2): 201-216.

Cheung, D. T., N. Perelman, E. C. Ko and M. E. Nimni (1985). "Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde III. Reaction with collagen in tissues." *Connect Tissue Res* **13**(2): 109-115.

Christie, G. W. (1992). "Anatomy of aortic heart valve leaflets: the influence of glutaraldehyde fixation on function." *Eur J Cardiothorac Surg* **6 Suppl 1**: S25-32; discussion S33.

Clark, M. A., F. G. Duhay, A. K. Thompson, M. J. Keyes, L. G. Svensson, R. O. Bonow, B. T. Stockwell and D. J. Cohen (2012). "Clinical and economic outcomes after surgical aortic valve replacement in Medicare patients." *Risk Manag Healthc Policy* **5**: 117-126.

Convelbo, C., P. Guetat, M. Cambillau, B. Allam, P. Bruneval, A. Lafont and R. Zegdi (2013). "Crimping and deployment of balloon-expandable valved stents are responsible for the increase in the hydraulic conductance of leaflets." *Eur J Cardiothorac Surg* **44**(6): 1045-1050.

Cribier, A., H. Eltchaninoff, A. Bash, N. Borenstein, C. Tron, F. Bauer, G. Derumeaux, F. Anselme, F. Laborde and M. B. Leon (2002). "Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description." *Circulation* **106**(24): 3006-3008.

de Buhr, W., S. Pfeifer, J. Slotta-Huspenina, E. Wintermantel, G. Lutter and W. A. Goetz (2012). "Impairment of pericardial leaflet structure from balloon-expanded valved stents." *J Thorac Cardiovasc Surg* **143**(6): 1417-1421.

De Marchena, E., J. Mesa, S. Pomenti, Y. K. C. Marin, X. Marincic, K. Yahagi, E. Ladich, R. Kutz, Y. Aga, M. Ragosta, A. Chawla, M. E. Ring and R. Virmani (2015). "Thrombus formation following transcatheter aortic valve replacement." *JACC Cardiovasc Interv* **8**(5): 728-739.

Deiwick, M., B. Glasmacher, D. T. Tjan, H. Reul, G. von Bally and H. H. Scheld (1998). "Holographic interferometry and in vitro calcification: comparing pericardial versus porcine bioprostheses." *J Heart Valve Dis* **7**(4): 419-427.

Del Trigo, M., A. J. Munoz-Garcia, H. C. Wijeyesundera, L. Nombela-Franco, A. N. Cheema, E. Gutierrez, V. Serra, J. Kefer, I. J. Amat-Santos, L. M. Benitez, J. Mewa, P. Jimenez-Quevedo, S. Alnasser, B. Garcia Del Blanco, A. Dager, O. Abdul-Jawad Altisent, R. Puri, F. Campelo-Parada, A. Dahou, J. M. Paradis, E. Dumont, P. Pibarot and J. Rodes-Cabau (2016). "Incidence, Timing, and Predictors of Valve Hemodynamic Deterioration After Transcatheter Aortic Valve Replacement: Multicenter Registry." *J Am Coll Cardiol* **67**(6): 644-655.

Demer, L. L. (2001). "Cholesterol in vascular and valvular calcification." *Circulation* **104**(16): 1881-1883.

Deutsch, M. A., N. P. Mayr, G. Assmann, A. Will, M. Krane, N. Piazza, S. Bleiziffer and R. Lange (2015). "Structural valve deterioration 4 years after transcatheter aortic valve replacement: imaging and pathohistological findings." *Circulation* **131**(7): 682-685.

Dove, J. S., D. Dobler, J. Davidson and G. A. Wright (2011). Capping bioprosthetic tissue to reduce calcification USA, Edwards Lifesciences Corporation

. US7972376 B1.

Duncan, A. C. and D. Boughner (1998). "Effect of dynamic glutaraldehyde fixation on the viscoelastic properties of bovine pericardial tissue." *Biomaterials* **19**(7-9): 777-783.

Dunn, J. M. and L. M. Marmon (1985). "Mechanisms of calcification of tissue valves." *Cardiol Clin* **3**: 385.

Dvir, D., H. Eltchaninoff, J. Ye, A. Kan, E. Durand, A. Bizios, A. Cheung, M. Aziz, M. Simonato, C. Tron, Y. Arbel, R. Moss, J. Leipsic, H. Ofek, G. Perlman, M. Barbanti, M. Seidman, A., P. Blanke, R. Yao, R. Boone, S. Lauck, S. Lichtenstein, D. Wood, A. Cribier and J. Webb (2016). First look at long-term durability of transcatheter heart valves: Assessment of valve function up to 10-years after implantation. *EuroPCR 2016*. Palais des Congrès, Paris.

Eckermann-Ross, C. (2008). "Hormonal regulation and calcium metabolism in the rabbit." Vet Clin North Am Exot Anim Pract **11**(1): 139-152, vii.

Elias, H. and L. J. Boyd (1960). "Notes on the anatomy, embryology, and histology of the pericardium. II." N Y Med Coll News Notes **2**: 50-75.

Eltchaninoff, H., A. Prat, M. Gilard, A. Leguerrier, D. Blanchard, G. Fournial, B. lung, P. Donzeau-Gouge, C. Tribouilloy, J. L. Debrux, A. Pavie, P. Gueret and F. R. Investigators (2011). "Transcatheter aortic valve implantation: early results of the FRANCE (FRench Aortic National CoreValve and Edwards) registry." Eur Heart J **32**(2): 191-197.

Escande, R., N. Khelil, I. DI Centa, C. Roques, M. Ba, F. Medjahed-Hamidi, F. Chaubet, D. Letourneur, E. Lansac and A. Meddahi-Pellé (2011). Pericardial Processing: Challenges, Outcomes and Future Prospects. Biomaterials Science and Engineering. R. Pignatello, InTech, Chapters 468.

Ferrans, V. J., Y. Tomita, S. L. Hilbert, M. Jones and W. C. Roberts (1987). "Pathology of bioprosthetic cardiac valves." Hum Pathol **18**(6): 586-595.

Fishbein, M. C., R. J. Levy, V. J. Ferrans, L. C. Dearden, A. Nashef, A. P. Goodman and A. Carpentier (1982). "Calcifications of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system." J Thorac Cardiovasc Surg **83**(4): 602-609.

Flameng, W., B. Meuris, J. Yperman, G. De Visscher, P. Herijgers and E. Verbeken (2006). "Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep." J Thorac Cardiovasc Surg **132**(1): 89-98.

Friday, K. E. and G. A. Howard (1991). "Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro." Metabolism **40**(6): 562-565.

Garcia Paez, J. M., E. Jorge Herrero, A. Carrera Sanmartin, I. Millan, A. Cordon, M. Martin Maestro, A. Rocha, B. Arenaz and J. L. Castillo-Olivares (2003). "Comparison of the mechanical behaviors of biological tissues subjected to uniaxial tensile testing: pig, calf and ostrich pericardium sutured with Gore-Tex." Biomaterials **24**(9): 1671-1679.

Gauvin, R., G. Marinov, Y. Mehri, J. Klein, B. Li, D. Larouche, R. Guzman, Z. Zhang, L. Germain and R. Guidoin (2013). "A comparative study of bovine and porcine pericardium to highlight their potential advantages to manufacture percutaneous cardiovascular implants." J Biomater Appl **28**(4): 552-565.

Giachelli, C. M. (1999). "Ectopic calcification: gathering hard facts about soft tissue mineralization." Am J Pathol **154**(3): 671-675.

Giachelli, C. M., N. Bae, M. Almeida, D. T. Denhardt, C. E. Alpers and S. M. Schwartz (1993). "Osteopontin is elevated during neointima formation in rat arteries and is a novel component of human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **92**(4): 1686-1696.

Girardot, J. M. (1990). Prevention of prosthesis calcification, Biomedical Design, Inc. **US 4,976,733 A**.

Golomb, G. (1987). "Controlled release of diphosphonates from synthetic polymers to inhibit calcification." J Biomater Appl **2**(2): 266-289.

Golomb, G., F. J. Schoen, M. S. Smith, J. Linden, M. Dixon and R. J. Levy (1987). "The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses." Am J Pathol **127**(1): 122-130.

Gong, G., Z. Ling, E. Seiffter, S. M. Factor and R. W. Frater (1991). "Aldehyde tanning: the villain in bioprosthetic calcification." Eur J Cardiothorac Surg **5**(6): 288-299; discussion 293.

Gott, J. P., C. Pan, L. M. Dorsey, J. L. Jay, G. K. Jett, F. J. Schoen, J. M. Girardot and R. A. Guyton (1992). "Calcification of porcine valves: a successful new method of antimineralization." Ann Thorac Surg **53**(2): 207-215; discussion 216.

Grande-Allen, K. J., A. Calabro, V. Gupta, T. N. Wight, V. C. Hascall and I. Vesely (2004). "Glycosaminoglycans and proteoglycans in normal mitral valve leaflets and chordae: association with regions of tensile and compressive loading." Glycobiology **14**(7): 621-633.

Grande-Allen, K. J., W. J. Mako, A. Calabro, Y. Shi, N. B. Ratliff and I. Vesely (2003). "Loss of chondroitin 6-sulfate and hyaluronan from failed porcine bioprosthetic valves." J Biomed Mater Res A **65**(2): 251-259.

Gross, L. and M. A. Kugel (1931). "Topographic Anatomy and Histology of the Valves in the Human Heart." *Am J Pathol* **7**(5): 445-474 447.

Gulino, S., M. Barbanti, W. Deste, S. Imme, P. Aruta, V. Bottari, E. Benvenuto, C. Tamburino, A. Di Landro, D. Liberto, L. Santonoceto, R. Sicuso, D. Di Stefano, D. Todaro, E. Di Simone, A. Indelicato, D. Giannazzo, C. Sgroi and C. Tamburino (2016). "Four-year durability of clinical and haemodynamic outcomes of transcatheter aortic valve implantation with the self-expanding CoreValve." *EuroIntervention* **12**(8): e1031-e1038.

Hammermeister, K., G. K. Sethi, W. G. Henderson, F. L. Grover, C. Oprian and S. H. Rahimtoola (2000). "Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial." *J Am Coll Cardiol* **36**(4): 1152-1158.

Harbaoui, B., P. Y. Courand, Z. Schmitt, F. Farhat, R. Dauphin and P. Lantelme (2016). "Early Edwards SAPIEN Valve Degeneration After Transcatheter Aortic Valve Replacement." *JACC Cardiovasc Interv* **9**(2): 198-199.

Harken, D. E., W. J. Taylor, A. A. Lefemine, S. Lunzer, H. B. Low, M. L. Cohen and J. A. Jacobey (1962). "Aortic valve replacement with a caged ball valve." *Am J Cardiol* **9**: 292-299.

Haziza, F., G. Papouin, B. Barratt-Boyes, G. Christie and R. Whitlock (1996). "Tears in bioprosthetic heart valve leaflets without calcific degeneration." *J Heart Valve Dis* **5**(1): 35-39.

Heinle, H. and V. Lindner (1984). "The binding of Evans blue to collagen and elastin in elastic tissue." *Arch Int Physiol Biochim* **92**(1): 13-17.

Hiester, E. D. and M. S. Sacks (1998a). "Optimal bovine pericardial tissue selection sites. I. Fiber architecture and tissue thickness measurements." *J Biomed Mater Res* **39**(2): 207-214.

Hiester, E. D. and M. S. Sacks (1998b). "Optimal bovine pericardial tissue selection sites. II. Cartographic analysis." *J Biomed Mater Res* **39**(2): 215-221.

Hilbert, S. L., V. J. Ferrans, H. A. McAllister and D. A. Cooley (1992). "Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprostheses. Histologic and ultrastructural studies." *Am J Pathol* **140**(5): 1195-1204.

Holt, J. P. (1970). "The normal pericardium." *Am J Cardiol* **26**(5): 455-465.

Hoshi, K., S. Kemmotsu, Y. Takeuchi, N. Amizuka and H. Ozawa (1999). "The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils." *J Bone Miner Res* **14**(2): 273-280.

Huang, G. and S. H. Rahimtoola (2011). "Prosthetic heart valve." *Circulation* **123**(22): 2602-2605.

Ishihara, T., V. J. Ferrans, S. W. Boyce, M. Jones and W. C. Roberts (1981a). "Structure and classification of cuspal tears and perforations in porcine bioprosthetic cardiac valves implanted in patients." *Am J Cardiol* **48**(4): 665-678.

Ishihara, T., V. J. Ferrans, M. Jones, S. W. Boyce, O. Kawanami and W. C. Roberts (1980). "Histologic and ultrastructural features of normal human parietal pericardium." *Am J Cardiol* **46**(5): 744-753.

Ishihara, T., V. J. Ferrans, M. Jones, S. W. Boyce and W. C. Roberts (1981b). "Occurrence and significance of endothelial cells in implanted porcine bioprosthetic valves." *Am J Cardiol* **48**(3): 443-454.

Jayakrishnan, A. and S. R. Jameela (1996). "Glutaraldehyde as a fixative in bioprostheses and drug delivery matrices." *Biomaterials* **17**(5): 471-484.

Jian, B., P. L. Jones, Q. Li, E. R. Mohler, 3rd, F. J. Schoen and R. J. Levy (2001). "Matrix metalloproteinase-2 is associated with tenascin-C in calcific aortic stenosis." *Am J Pathol* **159**(1): 321-327.

Jian, B., N. Narula, Q. Y. Li, E. R. Mohler, 3rd and R. J. Levy (2003). "Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis." *Ann Thorac Surg* **75**(2): 457-465; discussion 465-456.

Jorge-Herrero, E., P. Fernandez, N. de la Torre, C. Escudero, J. M. Garcia-Paez, J. Bujan and J. L. Castillo-Olivares (1994). "Inhibition of the calcification of porcine valve tissue by selective lipid removal." *Biomaterials* **15**(10): 815-820.

Jorge-Herrero, E., P. Fernandez, M. Gutierrez and J. L. Castillo-Olivares (1991). "Study of the calcification of bovine pericardium: analysis of the implication of lipids and proteoglycans." *Biomaterials* **12**(7): 683-689.

Kaden, J. J., S. Bickelhaupt, R. Grobholz, K. K. Haase, A. Sarikoc, R. Kilic, M. Brueckmann, S. Lang, I. Zahn, C. Vahl, S. Hagl, C. E. Dempfle and M. Borggreffe (2004). "Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulate aortic valve calcification." *J Mol Cell Cardiol* **36**(1): 57-66.

Kahlert, P., S. C. Knipp, M. Schlamann, M. Thielmann, F. Al-Rashid, M. Weber, U. Johansson, D. Wendt, H. G. Jakob, M. Forsting, S. Sack, R. Erbel and H. Eggebrecht (2010). "Silent and apparent cerebral ischemia after percutaneous transfemoral aortic valve implantation: a diffusion-weighted magnetic resonance imaging study." *Circulation* **121**(7): 870-878.

Kapadia, S. R., M. B. Leon, R. R. Makkar, E. M. Tuzcu, L. G. Svensson, S. Kodali, J. G. Webb, M. J. Mack, P. S. Douglas, V. H. Thourani, V. C. Babaliaros, H. C. Herrmann, W. Y. Szeto, A. D. Pichard, M. R. Williams, G. P. Fontana, D. C. Miller, W. N. Anderson, J. J. Akin, M. J. Davidson, C. R. Smith and P. t. investigators (2015). "5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement compared with standard treatment for patients with inoperable aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial." *Lancet* **385**(9986): 2485-2491.

Kheradvar, A., E. M. Groves, C. J. Goergen, S. H. Alavi, R. Tranquillo, C. A. Simmons, L. P. Dasi, K. J. Grande-Allen, M. R. Mofrad, A. Falahatpisheh, B. Griffith, F. Baaijens, S. H. Little and S. Canic (2015). "Emerging trends in heart valve engineering: Part II. Novel and standard technologies for aortic valve replacement." *Ann Biomed Eng* **43**(4): 844-857.

Khoffi, F. and F. Heim (2015). "Mechanical degradation of biological heart valve tissue induced by low diameter crimping: an early assessment." *J Mech Behav Biomed Mater* **44**: 71-75.

Kiefer, P., F. Gruenwald, J. Kempfert, H. Aupperle, J. Seeburger, F. W. Mohr and T. Walther (2011). "Crimping may affect the durability of transcatheter valves: an experimental analysis." *Ann Thorac Surg* **92**(1): 155-160.

Krucinski, S., I. Vesely, M. A. Dokainish and G. Campbell (1993). "Numerical simulation of leaflet flexure in bioprosthetic valves mounted on rigid and expansile stents." *J Biomech* **26**(8): 929-943.

Kulik, A., R. G. Masters, P. Bedard, P. J. Hendry, B. K. Lam, F. D. Rubens, T. G. Mesana and M. Ruel (2010). "Postoperative lipid-lowering therapy and bioprosthesis structural valve deterioration: justification for a randomised trial?" *Eur J Cardiothorac Surg* **37**(1): 139-144.

Langdon, S. E., R. Chernecky, C. A. Pereira, D. Abdulla and J. M. Lee (1999). "Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials." *Biomaterials* **20**(2): 137-153.

Lanir, Y. and Y. C. Fung (1974a). "Two-dimensional mechanical properties of rabbit skin. I. Experimental system." *J Biomech* **7**(1): 29-34.

Lanir, Y. and Y. C. Fung (1974b). "Two-dimensional mechanical properties of rabbit skin. II. Experimental results." *J Biomech* **7**(2): 171-182.

Lee, C. H. (2009). "Physiological variables involved in heart valve substitute calcification." *Expert Opin Biol Ther* **9**(8): 1031-1042.

Lee, J. M., S. A. Haberer and D. R. Boughner (1989). "The bovine pericardial xenograft: I. Effect of fixation in aldehydes without constraint on the tensile viscoelastic properties of bovine pericardium." *J Biomed Mater Res* **23**(5): 457-475.

Lentz, D. J. and E. M. Pollock (1982). Method for inhibiting mineralization of natural tissue during implantation USA, Vascor, Inc. **US 4,323,358 A**.

Lentz, D. J., E. M. Pollock, D. B. Olsen and E. J. Andrews (1982). "Prevention of intrinsic calcification in porcine and bovine xenograft materials." *Trans Am Soc Artif Intern Organs* **28**: 494-497.

Leon, M. B., C. R. Smith, M. J. Mack, R. R. Makkar, L. G. Svensson, S. K. Kodali, V. H. Thourani, E. M. Tuzcu, D. C. Miller, H. C. Herrmann, D. Doshi, D. J. Cohen, A. D. Pichard, S. Kapadia, T. Dewey, V. Babaliaros, W. Y. Szeto, M. R. Williams, D. Kereiakes, A. Zajarias, K. L. Greason, B. K. Whisenant, R. W. Hodson, J. W. Moses, A. Trento, D. L. Brown, W. F. Fearon, P. Pibarot, R. T. Hahn, W. A. Jaber, W. N. Anderson, M. C. Alu, J. G. Webb and P. Investigators (2016). "Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement in Intermediate-Risk Patients." *N Engl J Med* **374**(17): 1609-1620.

Levy, R. J., F. J. Schoen, W. B. Flowers and S. T. Staelin (1991). "Initiation of mineralization in bioprosthetic heart valves: studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by AlCl₃ or FeCl₃ preincubations." *J Biomed Mater Res* **25**(8): 905-935.

Levy, R. J., F. J. Schoen, J. T. Levy, A. C. Nelson, S. L. Howard and L. J. Oshry (1983). "Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats." *Am J Pathol* **113**(2): 143-155.

Li, K. and W. Sun (2010). "Simulated thin pericardial bioprosthetic valve leaflet deformation under static pressure-only loading conditions: implications for percutaneous valves." *Ann Biomed Eng* **38**(8): 2690-2701.

Liao, K., R. W. Frater, A. LaPietra, G. Ciuffo, C. F. Ilardi and E. Seiffter (1995). "Time-dependent effect of glutaraldehyde on the tendency to calcify of both autografts and xenografts." *Ann Thorac Surg* **60**(2 Suppl): S343-347.

Liu, A. C., V. R. Joag and A. I. Gotlieb (2007). "The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology." *Am J Pathol* **171**(5): 1407-1418.

Mack, M. J., M. B. Leon, C. R. Smith, D. C. Miller, J. W. Moses, E. M. Tuzcu, J. G. Webb, P. S. Douglas, W. N. Anderson, E. H. Blackstone, S. K. Kodali, R. R. Makkar, G. P. Fontana, S. Kapadia, J. Bavaria, R. T. Hahn, V. H. Thourani, V. Babaliaros, A. Pichard, H. C. Herrmann, D. L. Brown, M. Williams, J. Akin, M. J. Davidson, L. G. Svensson and P. t. investigators (2015). "5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial." *Lancet* **385**(9986): 2477-2484.

Makkar, R. R., G. Fontana, H. Jilaihawi, T. Chakravarty, K. F. Kofoed, O. de Backer, F. M. Asch, C. E. Ruiz, N. T. Olsen, A. Trento, J. Friedman, D. Berman, W. Cheng, M. Kashif, V. Jelnin, C. A. Kliger, H. Guo, A. D. Pichard, N. J. Weissman, S. Kapadia, E. Manasse, D. L. Bhatt, M. B. Leon and L. Sondergaard (2015). "Possible Subclinical Leaflet Thrombosis in Bioprosthetic Aortic Valves." *N Engl J Med* **373**(21): 2015-2024.

Mako, W. J., A. Shah and I. Vesely (1999). "Mineralization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve cusps in the subcutaneous rat model: analysis of variations in implant site and cuspal quadrants." *J Biomed Mater Res* **45**(3): 209-213.

Martin, C. and W. Sun (2013). "Modeling of long-term fatigue damage of soft tissue with stress softening and permanent set effects." *Biomech Model Mechanobiol* **12**(4): 645-655.

Martinez, R. M., P. W. O'Leary and R. H. Anderson (2006). "Anatomy and echocardiography of the normal and abnormal tricuspid valve." *Cardiol Young* **16** Suppl 3: 4-11.

Masters, R. G., J. Helou, A. L. Pipe and W. J. Keon (2001). "Comparative clinical outcomes with St. Jude Medical, Medtronic Hall and CarboMedics mechanical heart valves." *J Heart Valve Dis* **10**(3): 403-409.

Mavrilas, D., E. A. Sinouris, D. H. Vynios and N. Papageorgakopoulou (2005). "Dynamic mechanical characteristics of intact and structurally modified bovine pericardial tissues." *J Biomech* **38**(4): 761-768.

Mendoza-Novelo, B., E. E. Avila, J. V. Cauich-Rodriguez, E. Jorge-Herrero, F. J. Rojo, G. V. Guinea and J. L. Mata-Mata (2011). "Decellularization of pericardial tissue and its impact on tensile viscoelasticity and glycosaminoglycan content." *Acta Biomater* **7**(3): 1241-1248.

Mirnajafi, A., J. Raymer, M. J. Scott and M. S. Sacks (2005). "The effects of collagen fiber orientation on the flexural properties of pericardial heterograft biomaterials." *Biomaterials* **26**(7): 795-804.

Mohler, E. R., 3rd, F. Gannon, C. Reynolds, R. Zimmerman, M. G. Keane and F. S. Kaplan (2001). "Bone formation and inflammation in cardiac valves." *Circulation* **103**(11): 1522-1528.

Munnally, A. E., L. Cochrane, J. Leong and N. R. Vyavahare (2012). "Porcine vena cava as an alternative to bovine pericardium in bioprosthetic percutaneous heart valves." *Biomaterials* **33**(1): 1-8.

Muratori, M., L. Fusini, G. Tamborini, P. Gripari, S. Ghulam Ali, M. Mapelli, F. Fabbicocchi, P. Trabattoni, M. Roberto, M. Agrifoglio, F. Alamanni, A. L. Bartorelli and M. Pepi (2017). "Five-year

echocardiographic follow-up after TAVI: structural and functional changes of a balloon-expandable prosthetic aortic valve." *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*.

Muresian, H. (2016). "The clinical anatomy of the right ventricle." *Clin Anat* **29**(3): 380-398.

Naimark, W. A., J. M. Lee, H. Limeback and D. T. Cheung (1992). "Correlation of structure and viscoelastic properties in the pericardia of four mammalian species." *Am J Physiol* **263**(4 Pt 2): H1095-1106.

New, S. E. and E. Aikawa (2011). "Molecular imaging insights into early inflammatory stages of arterial and aortic valve calcification." *Circ Res* **108**(11): 1381-1391.

Nielsen, P. M., D. T. Malcolm, P. J. Hunter and P. G. Charette (2002). "Instrumentation and procedures for estimating the constitutive parameters of inhomogeneous elastic membranes." *Biomech Model Mechanobiol* **1**(3): 211-218.

Nkomo, V. T., J. M. Gardin, T. N. Skelton, J. S. Gottdiener, C. G. Scott and M. Enriquez-Sarano (2006). "Burden of valvular heart diseases: a population-based study." *Lancet* **368**(9540): 1005-1011.

O'Brien, K. D., D. D. Reichenbach, S. M. Marcovina, J. Kuusisto, C. E. Alpers and C. M. Otto (1996). "Apolipoproteins B, (a), and E accumulate in the morphologically early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **16**(4): 523-532.

Olsson, M., C. J. Dalsgaard, A. Haegerstrand, M. Rosenqvist, L. Ryden and J. Nilsson (1994). "Accumulation of T lymphocytes and expression of interleukin-2 receptors in nonrheumatic stenotic aortic valves." *J Am Coll Cardiol* **23**(5): 1162-1170.

Olsson, M., J. Thyberg and J. Nilsson (1999). "Presence of oxidized low density lipoprotein in nonrheumatic stenotic aortic valves." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(5): 1218-1222.

Ong, S. H., R. Mueller and S. Iversen (2012). "Early calcific degeneration of a CoreValve transcatheter aortic bioprosthesis." *Eur Heart J* **33**(5): 586.

Osnabrugge, R. L., A. M. Speir, S. J. Head, C. E. Fonner, E. Fonner, Jr., G. Ailawadi, A. P. Kappetein and J. B. Rich (2013). "Costs for surgical aortic valve replacement according to preoperative risk categories." *Ann Thorac Surg* **96**(2): 500-506.

Otto, C. M., D. J. Kumbhani, K. P. Alexander, J. H. Calhoun, M. Y. Desai, S. Kaul, J. C. Lee, C. E. Ruiz and C. M. Vassileva (2017). "2017 ACC Expert Consensus Decision Pathway for Transcatheter Aortic Valve Replacement in the Management of Adults With Aortic Stenosis: A Report of the American College of Cardiology Task Force on Clinical Expert Consensus Documents." *J Am Coll Cardiol* **69**(10): 1313-1346.

Otto, C. M., J. Kuusisto, D. D. Reichenbach, A. M. Gown and K. D. O'Brien (1994). "Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies." *Circulation* **90**(2): 844-853.

Otto, C. M., B. K. Lind, D. W. Kitzman, B. J. Gersh and D. S. Siscovick (1999). "Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly." *N Engl J Med* **341**(3): 142-147.

Oxenham, H., P. Bloomfield, D. J. Wheatley, R. J. Lee, J. Cunningham, R. J. Prescott and H. C. Miller (2003). "Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses." *Heart* **89**(7): 715-721.

Parhami, F., N. Mody, N. Gharavi, A. J. Ballard, Y. Tintut and L. L. Demer (2002). "Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation of marrow stromal cells." *J Bone Miner Res* **17**(11): 1997-2003.

Parhami, F., A. D. Morrow, J. Balucan, N. Leitinger, A. D. Watson, Y. Tintut, J. A. Berliner and L. L. Demer (1997). "Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(4): 680-687.

Pawade, T. A., D. E. Newby and M. R. Dweck (2015). "Calcification in Aortic Stenosis: The Skeleton Key." *J Am Coll Cardiol* **66**(5): 561-577.

Pohle, K., R. Maffert, D. Ropers, W. Moshage, N. Stilianakis, W. G. Daniel and S. Achenbach (2001). "Progression of aortic valve calcification: association with coronary atherosclerosis and cardiovascular risk factors." *Circulation* **104**(16): 1927-1932.

Radjeman, A., S. C. Liew and K. O. Lim (1985). "Anisotropic elasticity of bovine pericardial tissues." Jpn J Physiol **35**(5): 831-840.

Rahimtoola, S. H. (2003a). "Choice of prosthetic heart valve for adult patients." J Am Coll Cardiol **41**(6): 893-904.

Rahimtoola, S. H. (2003b). "The next generation of prosthetic heart valves needs a proven track record of patient outcomes at > or =15 to 20 years." J Am Coll Cardiol **42**(10): 1720-1721.

Rajamannan, N. M. (2011). "Calcific aortic valve disease: cellular origins of valve calcification." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(12): 2777-2778.

Rashedi, N. and C. M. Otto (2015). "Aortic Stenosis: Changing Disease Concepts." J Cardiovasc Ultrasound **23**(2): 59-69.

Redaelli, A., S. Vesentini, M. Soncini, P. Vena, S. Mantero and F. M. Montevercchi (2003). "Possible role of decorin glycosaminoglycans in fibril to fibril force transfer in relative mature tendons--a computational study from molecular to microstructural level." J Biomech **36**(10): 1555-1569.

Reece, I. J., R. van Noort, T. R. Martin and M. M. Black (1982). "The physical properties of bovine pericardium: a study of the effects of stretching during chemical treatment in glutaraldehyde." Ann Thorac Surg **33**(5): 480-485.

Restivo, A., A. Smith, J. L. Wilkinson and R. H. Anderson (1989). "The medial papillary muscle complex and its related septomarginal trabeculation. A normal anatomical study on human hearts." J Anat **163**: 231-242.

Richardt, D., T. Hanke and H. H. Sievers (2015). "Two cases of heart failure after implantation of a CoreValve prosthesis." N Engl J Med **372**(11): 1079-1080.

Rodes-Cabau, J. (2011). "Transcatheter aortic valve implantation: current and future approaches." Nat Rev Cardiol **9**(1): 15-29.

Sacks, M. S., C. J. Chuong and R. More (1994). "Collagen fiber architecture of bovine pericardium." ASAIO J **40**(3): M632-637.

Sans-Coma, V., B. Fernandez, A. C. Duran, G. Thiene, J. M. Arque, R. Munoz-Chapuli and M. Cardo (1996). "Fusion of valve cushions as a key factor in the formation of congenital bicuspid aortic valves in Syrian hamsters." Anat Rec **244**(4): 490-498.

Saxena, P., K. L. Greason and H. V. Schaff (2014). "Early structural valve deterioration of the Trifecta aortic valve biological prosthesis: a word of caution." J Thorac Cardiovasc Surg **147**(1): e10-11.

Schinke, T., M. D. McKee and G. Karsenty (1999). "Extracellular matrix calcification: where is the action?" Nat Genet **21**(2): 150-151.

Schoen, F. J., J. Fernandez, L. Gonzalez-Lavin and A. Cernaianu (1987). "Causes of failure and pathologic findings in surgically removed Ionescu-Shiley standard bovine pericardial heart valve bioprostheses: emphasis on progressive structural deterioration." Circulation **76**(3): 618-627.

Schoen, F. J. and R. J. Levy (1999). "Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives." J Biomed Mater Res **47**(4): 439-465.

Schoen, F. J. and R. J. Levy (2005). "Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention." Ann Thorac Surg **79**(3): 1072-1080.

Schoen, F. J., J. W. Tsao and R. J. Levy (1986). "Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization." Am J Pathol **123**(1): 134-145.

Scott, J. E. and M. Haigh (1985). "Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues." Biosci Rep **5**(1): 71-81.

Shah, S. R. and N. R. Vyavahare (2008). "The effect of glycosaminoglycan stabilization on tissue buckling in bioprosthetic heart valves." Biomaterials **29**(11): 1645-1653.

Shanahan, C. M., N. R. Cary, J. C. Metcalfe and P. L. Weissberg (1994). "High expression of genes for calcification-regulating proteins in human atherosclerotic plaques." J Clin Invest **93**(6): 2393-2402.

Shang, H., S. M. Claessens, B. Tian and G. A. Wright (2017). "Aldehyde reduction in a novel pericardial tissue reduces calcification using rabbit intramuscular model." J Mater Sci Mater Med **28**(1): 16.

Shen, M., A. Kara-Mostefa, L. Chen, M. Daudon, M. Thevenin, B. Lacour and A. Carpentier (2001). "Effect of ethanol and ether in the prevention of calcification of bioprostheses." *Ann Thorac Surg* **71**(5 Suppl): S413-416.

Shen, M., P. Marie, D. Farge, S. Carpentier, C. De Pollak, M. Hott, L. Chen, B. Martinet and A. Carpentier (1997). "Osteopontin is associated with bioprosthetic heart valve calcification in humans." *C R Acad Sci III* **320**(1): 49-57.

Shetty, R., P. Pibarot, A. Audet, R. Janvier, F. Dagenais, J. Perron, C. Couture, P. Voisine, J. P. Despres and P. Mathieu (2009). "Lipid-mediated inflammation and degeneration of bioprosthetic heart valves." *Eur J Clin Invest* **39**(6): 471-480.

Siddiqui, R. F., J. R. Abraham and J. Butany (2009). "Bioprosthetic heart valves: modes of failure." *Histopathology* **55**(2): 135-144.

Sievers, H. H. and C. Schmidtke (2007). "A classification system for the bicuspid aortic valve from 304 surgical specimens." *J Thorac Cardiovasc Surg* **133**(5): 1226-1233.

Simionescu, D., R. V. Iozzo and N. A. Kefalides (1989). "Bovine pericardial proteoglycan: biochemical, immunochemical and ultrastructural studies." *Matrix* **9**(4): 301-310.

Simionescu, D., A. Simionescu and R. Deac (1993). "Mapping of glutaraldehyde-treated bovine pericardium and tissue selection for bioprosthetic heart valves." *J Biomed Mater Res* **27**(6): 697-704.

Simionescu, D. T., J. J. Lovekamp and N. R. Vyavahare (2003a). "Extracellular matrix degrading enzymes are active in porcine stentless aortic bioprosthetic heart valves." *J Biomed Mater Res A* **66**(4): 755-763.

Simionescu, D. T., J. J. Lovekamp and N. R. Vyavahare (2003b). "Glycosaminoglycan-degrading enzymes in porcine aortic heart valves: implications for bioprosthetic heart valve degeneration." *J Heart Valve Dis* **12**(2): 217-225.

Sinha, A. and A. Kheradvar (2015). "Leaflet Calcification and Matrix Damage Due to Transcatheter Heart Valve Crimping." *Circulation* **132**(Suppl 3): 1.

Sinha, P., D. Zurakowski, T. K. Kumar, D. He, C. Rossi and R. A. Jonas (2012). "Effects of glutaraldehyde concentration, pretreatment time, and type of tissue (porcine versus bovine) on postimplantation calcification." *J Thorac Cardiovasc Surg* **143**(1): 224-227.

Sinning, J. M., M. Vasa-Nicotera, N. Werner, S. Zimmer, F. Mellert, A. Welz, E. Grube, G. Nickenig and C. Hammerstingl (2014). "CoreValve degeneration with severe transvalvular aortic regurgitation treated with valve-in-valve implantation." *JACC Cardiovasc Interv* **7**(7): e71-72.

Sizeland, K. H., H. C. Wells, J. Higgins, C. M. Cunanan, N. Kirby, A. Hawley, S. T. Mudie and R. G. Haverkamp (2014). "Age dependent differences in collagen alignment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium." *Biomed Res Int* **2014**: 189197.

Sodek, J., B. Ganss and M. D. McKee (2000). "Osteopontin." *Crit Rev Oral Biol Med* **11**(3): 279-303.

Soini, Y., T. Salo and J. Satta (2003). "Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis." *Hum Pathol* **34**(8): 756-763.

Speer, M. Y. and C. M. Giachelli (2004). "Regulation of cardiovascular calcification." *Cardiovasc Pathol* **13**(2): 63-70.

Steitz, S. A., M. Y. Speer, M. D. McKee, L. Liaw, M. Almeida, H. Yang and C. M. Giachelli (2002). "Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification." *Am J Pathol* **161**(6): 2035-2046.

Stewart, B. F., D. Siscovick, B. K. Lind, J. M. Gardin, J. S. Gottdiener, V. E. Smith, D. W. Kitzman and C. M. Otto (1997). "Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. Cardiovascular Health Study." *J Am Coll Cardiol* **29**(3): 630-634.

Summers, M. R., P. C. Cremer and W. A. Jaber (2017). "Three mechanisms of early failure of transcatheter aortic valves: Valve thrombosis, cusp rupture, and accelerated calcification." *J Thorac Cardiovasc Surg* **153**(5): e87-e93.

Sun, W., K. Li and E. Sirois (2010). "Simulated elliptical bioprosthetic valve deformation: implications for asymmetric transcatheter valve deployment." *J Biomech* **43**(16): 3085-3090.

Sun, W., M. Sacks, G. Fulchiero, J. Lovekamp, N. Vyavahare and M. Scott (2004). "Response of heterograft heart valve biomaterials to moderate cyclic loading." *J Biomed Mater Res A* **69**(4): 658-669.

Tayebjee, M. H., G. Y. Lip and R. J. MacFadyen (2005). "Matrix metalloproteinases in coronary artery disease: clinical and therapeutic implications and pathological significance." *Curr Med Chem* **12**(8): 917-925.

Thanassoulis, G., J. M. Massaro, R. Cury, E. Manders, E. J. Benjamin, R. S. Vasan, L. A. Cupple, U. Hoffmann, C. J. O'Donnell and S. Kathiresan (2010). "Associations of long-term and early adult atherosclerosis risk factors with aortic and mitral valve calcium." *J Am Coll Cardiol* **55**(22): 2491-2498.

Thubrikar, M., W. C. Piepgrass, J. D. Deck and S. P. Nolan (1980). "Stresses of natural versus prosthetic aortic valve leaflets in vivo." *Ann Thorac Surg* **30**(3): 230-239.

Thubrikar, M. J., J. Aouad and S. P. Nolan (1986). "Patterns of calcific deposits in operatively excised stenotic or purely regurgitant aortic valves and their relation to mechanical stress." *Am J Cardiol* **58**(3): 304-308.

Thubrikar, M. J., J. D. Deck, J. Aouad and S. P. Nolan (1983). "Role of mechanical stress in calcification of aortic bioprosthetic valves." *J Thorac Cardiovasc Surg* **86**(1): 115-125.

Tillquist, M. N. and T. M. Maddox (2011). "Cardiac crossroads: deciding between mechanical or bioprosthetic heart valve replacement." *Patient Prefer Adherence* **5**: 91-99.

Tod, T. J. and J. S. Dove (2016). "The association of bound aldehyde content with bioprosthetic tissue calcification." *J Mater Sci Mater Med* **27**(1): 8.

Toggweiler, S., K. H. Humphries, M. Lee, R. K. Binder, R. R. Moss, M. Freeman, J. Ye, A. Cheung, D. A. Wood and J. G. Webb (2013). "5-year outcome after transcatheter aortic valve implantation." *J Am Coll Cardiol* **61**(4): 413-419.

Trantina-Yates, A., C. Weissenstein, P. Human and P. Zilla (2001). "Stentless bioprosthetic heart valve research: sheep versus primate model." *Ann Thorac Surg* **71**(5 Suppl): S422-427.

Tzikas, A., C. J. Schultz, N. Piazza, A. Moelker, N. M. Van Mieghem, R. J. Nuis, R. J. van Geuns, M. L. Geleijnse, P. W. Serruys and P. P. de Jaegere (2011). "Assessment of the aortic annulus by multislice computed tomography, contrast aortography, and trans-thoracic echocardiography in patients referred for transcatheter aortic valve implantation." *Catheter Cardiovasc Interv* **77**(6): 868-875.

Vahanian, A., O. Alfieri, F. Andreotti, M. J. Antunes, G. Baron-Esquivias, H. Baumgartner, M. A. Borger, T. P. Carrel, M. De Bonis, A. Evangelista, V. Falk, B. Lung, P. Lancellotti, L. Pierard, S. Price, H. J. Schafers, G. Schuler, J. Stepinska, K. Swedberg, J. Takkenberg, U. O. Von Oppell, S. Windecker, J. L. Zamorano, M. Zembala, E. S. C. C. f. P. Guidelines, C. Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of and S. European Association for Cardio-Thoracic (2012). "Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): the Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)." *Eur J Cardiothorac Surg* **42**(4): S1-44.

van Geldorp, M. W., W. R. Eric Jamieson, A. P. Kappetein, J. Ye, G. J. Fradet, M. J. Eijkemans, G. L. Grunkemeier, A. J. Bogers and J. J. Takkenberg (2009). "Patient outcome after aortic valve replacement with a mechanical or biological prosthesis: weighing lifetime anticoagulant-related event risk against reoperation risk." *J Thorac Cardiovasc Surg* **137**(4): 881-886, 886e881-885.

van Steenberghe, M., C. Y. de Vasconcelos, D. Delay, L. Niclauss and M. Kirsch (2016). "Early transcatheter aortic valve degeneration in the young." *Int J Cardiol* **222**: 786-787.

Vesely, I. (1998). "The role of elastin in aortic valve mechanics." *J Biomech* **31**(2): 115-123.

Vesely, I. (2003). "The evolution of bioprosthetic heart valve design and its impact on durability." *Cardiovasc Pathol* **12**(5): 277-286.

Vesely, I., D. Boughner and T. Song (1988). "Tissue buckling as a mechanism of bioprosthetic valve failure." *Ann Thorac Surg* **46**(3): 302-308.

Vesely, I. and R. Noseworthy (1992). "Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic valve leaflets." *J Biomech* **25**(1): 101-113.

Vongpatanasin, W., L. D. Hillis and R. A. Lange (1996). "Prosthetic heart valves." N Engl J Med **335**(6): 407-416.

Vyavahare, N., D. Hirsch, E. Lerner, J. Z. Baskin, F. J. Schoen, R. Bianco, H. S. Kruth, R. Zand and R. J. Levy (1997). "Prevention of bioprosthetic heart valve calcification by ethanol preincubation. Efficacy and mechanisms." Circulation **95**(2): 479-488.

Vyavahare, N., M. Ogle, F. J. Schoen, R. Zand, D. C. Gloeckner, M. Sacks and R. J. Levy (1999). "Mechanisms of bioprosthetic heart valve failure: fatigue causes collagen denaturation and glycosaminoglycan loss." J Biomed Mater Res **46**(1): 44-50.

Vyavahare, N. R., D. Hirsch, E. Lerner, J. Z. Baskin, R. Zand, F. J. Schoen and R. J. Levy (1998). "Prevention of calcification of glutaraldehyde-crosslinked porcine aortic cusps by ethanol preincubation: mechanistic studies of protein structure and water-biomaterial relationships." J Biomed Mater Res **40**(4): 577-585.

Vyavahare, N. R., P. L. Jones, D. Hirsch, F. J. Schoen and R. J. Levy (2000). "Prevention of glutaraldehyde-fixed bioprosthetic heart valve calcification by alcohol pretreatment: further mechanistic studies." J Heart Valve Dis **9**(4): 561-566.

Walley, V. M., P. Bedard, M. Brais and W. J. Keon (1987). "Valve failure caused by cusp tears in low-profile Ionescu-Shiley bovine pericardial bioprosthetic valves." J Thorac Cardiovasc Surg **93**(4): 583-586.

Wang, H., J. M. Hanna, A. Ganapathi, J. E. Keenan, L. M. Hurwitz, J. P. Vavalle, T. L. Kiefer, A. Wang, J. K. Harrison and G. C. Hughes (2015). "Comparison of aortic annulus size by transesophageal echocardiography and computed tomography angiography with direct surgical measurement." Am J Cardiol **115**(11): 1568-1573.

Webb, C. L., W. E. Flowers, C. Horton, F. J. Schoen and R. J. Levy (1990). "Long-term efficacy of Al³⁺ for prevention of bioprosthetic heart valve calcification." ASAIO Trans **36**(3): M408-410.

Wright, G. A., J. M. Faught and J. M. Olin (2009). "Assessing anticalcification treatments in bioprosthetic tissue by using the New Zealand rabbit intramuscular model." Comp Med **59**(3): 266-271.

Yacoub, M., N. R. Rasmi, T. M. Sundt, O. Lund, E. Boyland, R. Radley-Smith, A. Khaghani and A. Mitchell (1995). "Fourteen-year experience with homovital homografts for aortic valve replacement." J Thorac Cardiovasc Surg **110**(1): 186-193; discussion 193-184.

Zegdi, R., D. Blanchard, A. Azarine, T. Folliguet and J. N. Fabiani (2012). "Elliptical shape of a SAPIEN XT prosthesis deployed in a patient with bicuspid aortic valve stenosis." J Heart Valve Dis **21**(6): 764-766.

Zegdi, R., P. Bruneval, D. Blanchard and J. N. Fabiani (2011). "Evidence of leaflet injury during percutaneous aortic valve deployment." Eur J Cardiothorac Surg **40**(1): 257-259.

Zioupos, P., J. C. Barbenel, D. J. Fisher and D. J. Wheatley (1993). "Changes in the mechanical properties of bioprosthetic valve leaflets made of bovine pericardium, as a result of long-term mechanical conditioning in vitro and implantation in vivo." J Mater Sci Mater Med **4**(6): 531-537.

Zioupos, P., J. C. Barbenel and J. Fisher (1992). "Mechanical and optical anisotropy of bovine pericardium." Med Biol Eng Comput **30**(1): 76-82.

