



HAL
open science

Caractérisation de l'hémocompatibilité acquise du coeur artificiel total Aeson (Carmat, A-TAH)

Christophe Peronino

► **To cite this version:**

Christophe Peronino. Caractérisation de l'hémocompatibilité acquise du coeur artificiel total Aeson (Carmat, A-TAH). Hématologie. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT: 2023UNIP5110 . tel-04774346

HAL Id: tel-04774346

<https://theses.hal.science/tel-04774346v1>

Submitted on 8 Nov 2024

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.

UNIVERSITÉ PARIS CITÉ

MTCI ED 563

CARACTÉRISATION DE L'HÉMOCOMPATIBILITÉ ACQUISE
DU CŒUR ARTIFICIEL TOTAL AESON (Carmat, A-TAH)

THÈSE DE DOCTORAT

DISCIPLINE : HEMATOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement le 31 octobre 2023

à

Université Paris Cité

UMR_S 1140 IThEM, Innovations Thérapeutiques en Hémostase
(Innovative Therapies in Haemostasis)

par

Christophe PERONINO

Dirigée par

Le Professeur David SMADJA

Jury de thèse :

Dr Isabelle GOUIN-THIBAUT, MCU-PH, Université de Rennes

Pr Jean Christian ROUSSEL, PU-PH, Université de Nantes

Pr Christian LATREMOUILLE, Professeur, Université Paris Cité

Pr David SMADJA, PU-PH, Université Paris Cité

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier :

Madame le Docteur Isabelle GOUIN, pour avoir accepté d'être rapporteur de mon mémoire de thèse d'université.

Monsieur le Professeur Jean-Christian ROUSSEL, pour avoir également accepté d'être rapporteur de mon mémoire de thèse d'université.

Madame le Professeur Pascale GAUSSEM, pour m'avoir si bien accueilli dans votre unité de recherche.

Monsieur le Professeur Christian LATREMOUILLE, pour avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse d'université.

Madame le Docteur Anne-Céline MARTIN, pour votre aide au cours de cette dernière.

Monsieur le Professeur David SMADJA, pour l'opportunité qui m'a été offerte de travailler dans votre équipe, pour m'avoir offert l'opportunité de faire une thèse CIFRE et votre soutien même dans les moments les plus difficiles pour moi. Vous m'avez apporté beaucoup, votre esprit critique, votre esprit scientifique et votre rigueur, que je me suis efforcé de suivre tout au long de mon travail. Merci pour votre encadrement et votre patience, je m'efforcerai de suivre durant ma carrière votre exemple qui m'a marqué.

L'équipe scientifique de CARMAT avec à sa tête madame Marie GABILLET, merci pour votre soutien et pour m'avoir encadré chez CARMAT ainsi que pour l'aide et la bienveillance que vous m'avez apporté.

Liste des abréviations

ACC/AHA : American College of Cardiology/American Heart Association

ACE : Angiotensin conversion enzyme

ACM : Assistance circulatoire mécanique

ADAMTS13 : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif type 1 member 13

AIT : Accident ischémique transitoire

ARAI : Antagoniste au récepteur à l'angiotensine

A-TAH : Aeson total artificial heart

AVC : Accident cérébrovasculaire

AVK : Anti vitamine K

AVM : Arteriovenous malformation / Malformation artéro-veineuse

AVWS : Acquired von Willebrand syndrome / syndrome de Willebrand acquis

Bpm : Battement par minute

BTB : Bridge to bridge

BTR : Bridge to recovery

BTT : Bridge to transplant

BiVAD : Biventricular assist device

CEC : Circulation extracorporelle

CF-LVAD : Continuous flow left ventricular assist device

CI : Confidence interval

CRP : C reactive protein

DT : Destination Therapy

EPPY : Event per patient year

ePTFE : expanded Polytetrafluoroethylene

FDA : Food and Drugs Administration

FVIII : Facteur VIII

HF : Heart Failure

HM : HeartMate

HMWM : High molecular weight multimers/Multimères de haut poids moléculaire

IC : Insuffisance cardiaque

IL : Interleukine

IMWM : Intermediate molecular weight multimers / Multimère de poids moléculaire intermédiaire

INTERMACS : Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support

INR : Index normalized ratio

ISTLH : International society for heart & lung transplantation

LDH : Lactate déshydrogénase

LVAD : left ventricular assist device

LMWM : Low molecular weight multimers / Multimères de bas poids moléculaire

MCS : Mechanical circulatory support

mmHg : millimetres of mercury

NO : Oxyde nitrique

NOS : Nitric oxide synthase

NYHA : New-York Heart association

PEEK : Polyetherréthercétone

PF-VAD : Pulsatile flow ventricular assist device

PU : Polyuréthane

PVAD : Paracorporeal ventricular assist device

RAAS : Renin-aldosterone-angiotensine system

RVAD : Right ventricular assist device

TAH : Total artificial heart

VAD : Ventricular assist device

VWD : Von Willebrand disease / Maladie de Willebrand

VWF : Von Willebrand factor

Résumé

Caractérisation de l'hémoncompatibilité acquise du Coeur artificiel total Aeson (Carmat, A-TAH)

Le coeur Artificiel Total Aeson de CARMAT est une assistance circulatoire mécanique permettant d'apporter une solution thérapeutique aux patients atteints d'insuffisance cardiaque en phase terminale. Après le retrait des ventricules du patient, Aeson remplace ces ventricules pour mimer la fonction cardiaque. L'un des principaux aspects de ces dispositifs médicaux est l'hémocompatibilité c'est-à-dire l'absence de réactivité forte lorsque le sang entre en contact ce dispositif. L'hémocompatibilité se caractérise par plusieurs éléments : la formation de thrombus, l'apparition d'hémorragie, l'activation de l'inflammation et la consommation des acteurs du système du complément. Le but de ce travail de thèse est d'approfondir nos connaissances sur l'hémocompatibilité acquise par le coeur artificiel total Aeson. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à deux paramètres pouvant caractériser cette hémocompatibilité : l'atteinte du facteur Willebrand ainsi que la potentiel réaction inflammatoire après l'implantation. Pour se faire, nous avons mis au point une analyse semi-automatisé de la multimérisation du facteur von Willebrand. Ensuite, nous avons analysé les multimères du facteur von Willebrand après implantation d'un coeur Aeson en le comparant avec des assistances circulatoires du ventricule gauche HeartMate II et HeartMate 3. Ce travail présente également une étude sur les paramètres cellulaires et cytokiniques de l'inflammation chez les patients implantés avec les dispositifs cités précédemment, afin d'observer si ces assistances circulatoires cardiaques entraînent un contexte pro-inflammatoire chronique chez les patients. Nos résultats démontrent que l'implantation d'un coeur Aeson n'induit pas de désordres significatifs dans les paramètres d'hémocompatibilité sur le facteur Willebrand et les paramètres inflammatoires ce qui permet d'envisager l'implantation d'un coeur Aeson comme une alternative fiable à la greffe cardiaque ou à d'autres types d'assistances circulatoires.

Mots-clés

Coeur artificiel total, Assistance circulatoire mécanique, Bioprothèse, Inflammation, Implantation cardiaque, Hémocompatibilité, Facteur von Willebrand, Hémostase, Péricarde bovin, Endothélialisation

Summary

Characterization of the acquired hemocompatibility of the Aeson total artificial heart (Carmat, TAH)

The CARMAT Aeson Total Artificial Heart is a mechanical circulatory support system that provides a therapeutic solution for patients with end-stage heart failure. After the removal of the patient's ventricles, Aeson replaces these ventricles to mimic cardiac function. One of the main aspects of these medical devices is hemocompatibility, which refers to the absence of a strong reactivity when blood comes into contact with the device. Hemocompatibility is characterized by several elements: thrombus formation, occurrence of bleeding, activation of inflammation, and consumption of complement system components. The aim of this thesis work is to deepen our knowledge of the hemocompatibility acquired by the Aeson total artificial heart. During this thesis, we focused on two parameters that can characterize this hemocompatibility: the impact on von Willebrand factor and the potential inflammatory reaction after implantation. To achieve this, we developed a semi-automated analysis of von Willebrand factor multimerization. Subsequently, we analyzed the von Willebrand factor multimers after the implantation of an Aeson heart, comparing it with left ventricular circulatory support devices such as the HeartMate II and HeartMate 3. This work also presents a study on cellular and cytokine parameters of inflammation in patients implanted with the aforementioned devices, to observe if these cardiac circulatory support systems lead to a chronic pro-inflammatory environment in patients. Our results demonstrate that the implantation of an Aeson heart does not induce significant disturbances in hemocompatibility parameters related to von Willebrand factor and inflammatory parameters, which suggests that the implantation of an Aeson heart can be considered a reliable alternative to heart transplantation or other types of circulatory support.

Keywords

Total artificial heart, Hémocompatibility, Circulatory assist device, bioprosthesis, Inflammation, Cardiac implantation, Von Willebrand factor, Hemostasis, Bovin pericardium, Endothelialization

Table des matières

Remerciements	1
Liste des abréviations.....	2
Résumé.....	4
Mots-clés.....	4
Summary	5
Keywords.....	5
Table des matières	6
Introduction :	8
1.1. L'insuffisance cardiaque et ses traitements	8
L'insuffisance cardiaque	8
Les traitements de l'insuffisance cardiaque.....	12
Fraction d'éjection du ventricule gauche réduit	12
Insuffisance Cardiaque Congestive (ICC) et Œdème	13
Insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée	14
Insuffisance cardiaque en décompensation aiguë.....	15
Traitement par Assistance circulatoire mécanique	15
1.2. Les assistances ventriculaires.....	19
HeartMate II	21
HeartMate 3	22
Cœur artificiel total	25
Syncardia	27
1.3. Aeson	31
Historique de l'entreprise et de la Bioprothèse	31
Les essais cliniques.....	34
Etude de faisabilité (2014)	39
Etude PIVOT	39
Early Feasibility Study (EFS aux US).....	40
Etude EFICAS	41
Implantation commerciale	41
Caractéristique du dispositif	41
Les matériaux synthétiques	44

L'ePTFE.....	44
Dacron.....	46
Polyuréthane.....	48
Le péricarde, matériau xénogénique.....	50
1.4. Hémocompatibilité des LVAD et des TAH.....	51
Thrombose de la pompe.....	52
<u>Les hypothèses pathophysiologiques de la thrombose</u>	54
Thrombose/hémolyse.....	54
Thrombose/dysfonction endothéliale.....	55
Thrombose/Inflammation.....	59
Hémorragies.....	63
Acteurs du saignement dans les MCS : rappels physiologiques.....	63
Le facteur von Willebrand (VWF).....	63
Plaquette.....	68
Les accidents vasculaire cérébraux liés aux MCS.....	76
Infection.....	78
Objectifs de travail de la thèse.....	82
Résultats.....	83
3.1. Évaluation d'un test semi-automatisé de quantification des multimères du facteur von Willebrand. Evaluation of a semi-automated test for quantification of von Willebrand multimers.	83
3.2. Bioprosthetic Total Artificial Heart in Autoregulated Mode Is Biologically Hemocompatible: Insights for Multimers of von Willebrand Factor.....	112
3.3. Bioprosthetic Total Artificial Heart Implantation Does Not Induce Chronic Inflammation	133
Discussion.....	145
4.1. Les multimères de facteur von Willebrand.....	145
4.2. Le facteur von Willebrand en tant que biomarqueur d'hémocompatibilité.....	146
4.3. Présence de marqueurs inflammatoires chez les patients implantés avec un cœur artificiel total Aeson.....	147
4.4. Discussion globale hémocompatibilité du TAH-Aeson.....	148
Perspectives.....	149
5.1. Perspectives cliniques Carmat.....	149
5.2. Vers un dispositif hémocompatible.....	149
Références bibliographiques.....	151

Introduction :

Le cœur bioprothétique artificiel total Aeson™ de Carmat est un dispositif d'assistance circulatoire mécanique, comme tous les cœurs artificiels. Dans la suite de cette thèse, Aeson™ sera abrégé A-TAH. A-TAH est utilisé comme traitement des patients atteints d'insuffisance cardiaque biventriculaire en stade terminal.

1.1. L'insuffisance cardiaque et ses traitements

L'insuffisance cardiaque

L'insuffisance cardiaque (IC) est une maladie se caractérisant par l'incapacité du cœur à remplir ses fonctions systémiques, systole et diastole, empêchant ainsi l'oxygénation des organes. Elle est diagnostiquée chez les patients présentant des symptômes tels que la dyspnée et des signes caractéristiques comme la tachycardie, des râles crépitants pulmonaires, un épanchement pleural, etc. Ces derniers ne sont toutefois pas suffisants pour poser un diagnostic précis, qui nécessite une preuve d'une anomalie structurelle ou fonctionnelle. Cette maladie est hétérogène, car elle peut être la conséquence de l'apparition de différentes pathologies cardio-vasculaires, telles que les cardiomyopathies, les cardiopathies valvulaires, l'arythmie et d'autres causes plus rares. L'IC est une maladie dont on estime aujourd'hui la prévalence à 26 millions d'individus dans le monde¹. Dans les pays développés, c'est l'une des principales causes d'admission à l'hôpital (67 000 admissions par an au Royaume-Uni², et en France, la prévalence est de 2,3 %, soit 1 130 000 individus d'après la Haute Autorité Sanitaire en 2014) et elle augmente drastiquement, jusqu'à 15 %, pour les personnes de plus de 85 ans en France. Il est à noter que la prévalence augmente du fait du vieillissement de la population et de l'apparition de traitements plus efficaces améliorant ainsi la survie des patients sur le long terme. L'IC reste néanmoins de

mauvais pronostic, car 5 ans après le diagnostic le taux de mortalité est très élevé, 52.6 en totalité : 24.4% pour les personnes âgées de 60 ans et 54.4% pour celles de plus de 80 ans². L'apparition de l'IC se remarque par rapport au diagnostic des symptômes, qui peuvent être plus ou moins sévères. Des classifications ont été créées selon la gravité des symptômes observés chez les personnes atteintes, telles que celles du New York Heart Association (NYHA) établies en 1994. Les patients y sont catégorisés en 4 classes distinctes, permettant d'en appréhender la sévérité. Les caractéristiques définissant chaque classe dépendent de l'effort physique fourni par le patient pour observer les symptômes et de sa limitation dans les activités physiques³.

Classes	Description et symptômes du patient
I	L'activité physique normale n'induit pas de symptômes*. Activité physique normale
II	Symptômes* légers pendant une activité physique normale. Aucune gêne au repos et légère limitation des activités physiques
III	Apparition de symptômes* pour une légère activité physique. Ne ressent pas de gêne qu'au repos. Limitation marquée de l'activité physique
IV	Symptômes* sévères apparaissant avec une activité physique légère voir même au repos. Incapable de pratiquer une activité physique

*Symptômes : Fatigue excessive, palpitations, dyspnée, syncope, douleurs thoraciques

Tableau 1 : Classification des classes NYHA pour l'insuffisance cardiaque

Ne se basant que sur les observations des patients à l'instant de leur diagnostic, une autre classification établit par l'American College of Cardiology et l'American Heart Association (ACC/AHA) en 2001 propose, elle, de classer les patients en ajoutant leurs antécédents et leurs risques de développer une IC⁴ et est régulièrement mis à jour.

Stade	Descriptions
A	Patients risquant de développer une IC, présentant différents caractères aggravants tels qu'hypertension, diabète de type 2, exposition a des agents cardiotoxiques, des maladies cardiovasculaires ou de proches parents avec des cardiomyopathies. Ces patients ne présentent généralement aucune anomalie structurelle ou fonctionnelle des tissus cardiaques et ne montrent pas de symptômes d'IC
B	Patients catalogué pré-HF, après des analyses préventives. Un des éléments marquants est le volume d'éjection du ventricule gauche, si $\leq 40\%$. Ces patients sont encore asymptomatiques, mais présentent des anomalies fonctionnelles et structurelles, différents traitements et changements dans la qualité de vie sont initiés. Les patients anciennement C retournent dans cette catégorie en cas de rémission
C	Ces patients présentent ou ont présenté des symptômes de l'IC. Ils ont une maladie structurelle du cœur et ont un volume d'éjection du ventricule gauche $\leq 40\%$ de manière chronique. Les patients sont relativement stables s'ils répondent aux traitements. Sinon la maladie progresse
D	Patients C présentant des symptômes marqués d'IC qui interfèrent avec la vie quotidienne malgré les traitements médicaux. Ces patients sont dits IC avancés, ils développent au moins 2 de ces critères : dyspnée, syncopes etc. Ils présentent des anomalies sévères valvulaire ou des maladies cardiaques congénitales. Ils présentent également une congestion vasculaire, interstitielle, pulmonaire ou périphérique. Les traitements les plus invasifs sont recommandés, implantation cardiaques ou d'assistance circulatoire mécanique

Tableau 2 : Classification ACC/AHA des stades de l'insuffisance cardiaque

Le score Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) est une méthode de classification dans le cas des patients en état d'IC avancée. Celui-ci permet de caractériser les patients avec un NYHA de classe 3 et 4 (et donc catalogué stade D avec le classement ACC/AHA). Parmi ces cas d'IC avancée, 7 profils sont ainsi créés pour catégoriser les états les plus graves de l'insuffisance cardiaque⁴.

Profils	Description
1 : Choc cardiogénique critique	Hypotension menaçant le pronostic vital du patient malgré l'intensification de traitements inotropique, accompagné d'une hypoperfusion critique des organes souvent confirmé par des niveaux alarmants d'acidose et de lactate.
2 : Déclin progressif	"Dépendant" des supports inotropes mais le patient montre un déclin progressif en nutrition, fonction rénale, de l'équilibre volémique. Peut aussi s'appliquer aux patients montrant des altérations de perfusions, où la perfusion de support inotrope ne peut être maintenue en raison de tachyarythmies, d'ischémie clinique ou autres intolérances.
3 : Stable mais inotrope dépendant	Cliniquement stable avec des doses légères à modérées d'inotropes intraveineux (ou avec un dispositif d'assistance circulatoire temporaire) après une répétition documentée des échecs du sevrage sans hypotension symptomatique, d'aggravation des symptômes ou de dysfonctionnement progressif d'un organe (généralement rénal).
4 : Symptômes au repos avec traitement par voie orale	Patient retourné à domicile sous traitement par voie orale, mais présentant de manière récurrente des symptômes de congestion au repos ou lors des activités de la vie quotidienne. Il peut présenter une orthopnée, un essoufflement, des symptômes gastro-intestinaux, une ascite invalidante ou un œdème sévère des membres inférieurs.
5 : Intolérant à l'effort	Patient confortable au repos mais incapable de s'engager dans une activité physique, le limitant à la sédentarité et aux activités dans le voisinage.
6 : Effort limité	Patient confortable au repos sans charge volémique apparente. Il est capable d'activités physiques légères. Les activités de la vie quotidienne sont aisées et des activités mineures en dehors du domicile, telles que rendre visite à des amis ou aller au restaurant, peuvent être réalisées, mais la fatigue apparaît en quelques minutes ou lors de tout effort physique significatif.
7 : NYHA de classe III avancée	Patient cliniquement stable étant confortable en cas d'activité physique raisonnable, malgré des épisodes récents/récurrents d'équilibre volémique instable. Tous traitements diurétiques et hospitalisation au cours du mois fait de cette personne un profil 6 voir inférieur.

Tableau 3 : Classification INTERMACS des profils d'insuffisance cardiaque

Les traitements de l'insuffisance cardiaque

Pour les patients dont les cas sont aux stades les plus bas, les traitements pharmacologiques sont réduits au strict minimum, et ceux qui s'avèrent particulièrement à risques sont soumis à des analyses complémentaires, comme notamment le suivi de la pression artérielle, un séquençage génétique pour les patients avec des antécédents familiaux à la recherche de variants responsables de cardiomyopathies ou encore des recommandations de changement de qualité de vie. Les patients en stade B recevront eux des traitements déterminés en fonction des premiers symptômes diagnostiqués.

Fraction d'éjection du ventricule gauche réduit

Ceux ayant un volume d'éjection du ventricule gauche (Left Ventricular Ejection Fraction LVEF) $\leq 40\%$. Ces cas apparaissent chez les patients avec un remodelage cardiaque, qui se traduit par :

- Une déformation du ventricule gauche qui devient hypertrophié, étant la conséquence d'une perte en nombre et de fonction des cardiomyocytes remplacés par des fibrocytes au cours d'un phénomène de fibrose interstitielle, créant des arythmies potentiellement fatales.
- Une vasoconstriction artérielle périphérique qui provoque une augmentation de la pression artérielle, qui conduisent à des congestions pulmonaires et périphériques (formation d'œdèmes)⁵.

Le trouble de la régulation du système neuro-hormonal rénine-angiotensine-aldostérone est délétère pour les patients et est considéré comme l'une des causes de l'IC (parmi les troubles du système nerveux sympathique, l'apparition d'inflammation, etc.), car il influe sur la régulation de la pression artérielle. Des études ont montré que les patients traités avec des inhibiteurs des enzymes liées à la transformation et à la conversion de l'angiotensine

amélioreraient leur pronostic vital. Ainsi, l'inhibiteur du récepteur à l'angiotensine de la Néphriline est utilisé dans la majorité des cas, de même que l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACEi) et les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine (ARB)^{5,6}. Un autre traitement du système rénine-angiotensine-aldostérone est l'utilisation d'antagonistes des récepteurs minéralo-corticoïdes, des antagonistes de l'aldostérone, ce traitement montre également une amélioration du pronostic vital des patients traités⁵.

L'utilisation de β -bloquants est aussi recommandée pour améliorer la survie des patients atteints d'IC, réduisant les causes d'hospitalisation pour IC, améliorant les symptômes de LVEF et diminuant les cas de mort subite. Cependant, ils sont contre-indiqués pour les patients souffrant d'asthme.

De nouvelles recommandations sont apparues avec l'inhibition du cotransporteur 2 Sodium Glucose (SGLT2) utilisée pour les patients atteints de diabète de type 2. Il a été montré que l'efficacité du traitement n'était pas liée à la diminution de la glycémie. Le mécanisme lié aux bénéfices de ce traitement reste non identifié ; néanmoins, il est aujourd'hui utilisé pour tous les patients atteints d'IC, bien qu'utilisé de manière parcimonieuse dans les essais cliniques. Il est important de noter qu'il peut provoquer une forte perte de poids et des infections des tissus mous et des organes génitaux.

Insuffisance Cardiaque Congestive (ICC) et Œdème

Les patients en IC présentent dans la plupart des cas des symptômes tels qu'une insuffisance cardiaque congestive et/ou la formation d'œdème dans les membres inférieurs. Les patients présentant ces symptômes sont traités avec des diurétiques. Les diurétiques bumétanide, furosémide et la torsémide inhibent la réabsorption des électrolytes sodium et chlore, améliorant ainsi les symptômes et empêchant l'aggravation de l'IC.

Dans le cas des patients atteints d'ICC qui ne répondent pas à ces traitements, des diurétiques thiazidiques sont ajoutés au traitement de base. Ils agissent dans le tubule contourné distal de la hanse de Henlé. Les doses ne sont pas normalisées et doivent être établies pour chaque patient. Elles sont souvent sous-dosées, ce qui n'améliore pas la congestion. En revanche, si le dosage est trop fort, cela peut conduire à une détérioration de la fonction rénale, une hypovolémie et une hypokaliémie.

Insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection préservée

Ce cas d'IC représente un peu plus de la moitié des IC diagnostiqués. Ils sont néanmoins difficile à diagnostiquer, avec une mortalité de 15%^{4,6}. La pathophysiologie de ce cas d'IC est multi-systémique, elle entraîne des conséquences sur le système cardiaque, pulmonaires, le côté droit du cœur, vasculaires, le système métabolique et les muscles squelettiques, la fonction rénale et hépatique tout en conservant une fraction d'éjection supérieure 50%. Pour diagnostiquer une IC avec préservation de la fraction d'éjection, il est nécessaire d'observer une augmentation de la pression de remplissage cardiaques au repos et à l'effort. Cela peut être mesurer par cathétérisme cardiaque droit ou alors observé par radiographie du torse, échocardiographie. Des patients peuvent néanmoins se présenter avec une dyspnée inexpliquée, sans aucun des signes listés ci-dessus et sans congestion, ils peuvent être confondus avec des cas d'obésités ou de perte de condition physique s'ils ne sont pas soumis à un test à l'effort.

Cette forme d'IC présente des troubles hétérogènes, auxquels ont contribué des comorbidités telles que l'hypertension, le diabète, l'obésité, la maladie coronarienne, l'insuffisance rénale chronique, et des causes spécifiques telles que l'amylose cardiaque. Une tentative de déterminer un biomarqueur a été établie avec le peptide natriurétique de type B (BNP - Brain natriuretic peptide). Cette protéine est active sous cette forme et a un effet diurétique. Elle est sécrétée par les cardiomyocytes (en proBNP en intracellulaire qui est la forme précurseur inactive) pendant une augmentation des pressions intracardiaques systoliques ou diastoliques. Une fois sécrété, elle passe de précurseur pro-BNP à BNP, active, puis est clivé en NT-proBNP qui redevient inactive. Néanmoins, ces biomarqueurs ne sont pas concluant pour diagnostiquer de manière fiable l'IC avec fraction d'éjection préservée, car d'autres facteurs cardiaques et non cardiaques expliquent leur présence dans le sang comme la fibrillation auriculaire, l'obésité, l'infarctus du myocarde, l'embolie pulmonaire, l'âge avancé, les maladies pulmonaires et le dysfonctionnement rénal^{4,6}.

Il n'y a pas de traitements particuliers pour la forme préservée de la fraction d'éjection, les causes des symptômes sont traités, recevant des traitements diurétiques

autant que nécessaires, du SGLT2i pour les patients supportant ce médicament, sinon les inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone (ARNi, ARB et MRA)⁴.

Insuffisance cardiaque en décompensation aiguë

L'insuffisance cardiaque aiguë (ADHF) est une maladie dont la pathophysiologie reste incomplète et dont les solutions thérapeutiques sont limitées. Elle reste encore aujourd'hui une des causes de diagnostics d'admissions dans le monde^{4,7}. Cette forme d'IC aiguë amène le patient à être hospitalisé de manière répétée à chaque occurrence de la maladie, engageant le pronostic vital à court et à long terme ainsi qu'à une défaillance progressive multi-organe. Il n'y a pas de traitement particulier pour l'ADHF, aucune étude n'a pu déterminer un traitement améliorant le pronostic vital des patients ou encore réduisant la morbidité. Les traitements consistent donc à soulager les symptômes, les congestions, les œdèmes et arythmies afin de ralentir la propagation de la défaillance multi-organe. Des traitements diurétiques sont principalement utilisés pour la congestion, de vasodilatateurs et d'inotropes.

Traitement par Assistance circulatoire mécanique

Les assistances circulatoires mécaniques sont des dispositifs médicaux remplaçant partiellement ou totalement la fonction cardiaque et/ou respiratoire. Elles peuvent être de courte durée, comme les ECMO (extra corporeal membrane oxygenation), avec une implantation de moins d'un mois (< 30 jours), ou de plus longue durée (implantation > 30 jours).

Les assistances circulatoires mécaniques font partie des solutions thérapeutiques pour les cas avancés d'insuffisances cardiaques ne répondant plus aux traitements pharmacologiques et ne pouvant obtenir une transplantation cardiaque. Cette dernière est la meilleure solution pour le patient en phase terminale d'IC, mais en raison de la demande grandissante d'organes et du faible nombre de donneurs, peu de patients arrivent au bout de l'attente pour ce traitement.

Pour répondre à ce problème, les assistances mécaniques cardiaques sont utilisées. Elles permettent de maintenir des conditions hémodynamiques stables pour le patient, lui permettant de récupérer la fonction des organes défaillants, comme le ou les ventricules, de maintenir le patient en attente d'une transplantation cardiaque ou, dans les cas les plus extrêmes et plus rares, devenir une solution thérapeutique définitive.

Les patients ayant ces critères seront potentiellement éligible à l'utilisation d'une assistance mécanique cardiaque

- Hospitalisations fréquentes pour l'IC
- Limitations fonctionnelles similaires aux classes III à IV de la NYHA malgré un traitement maximal
- Intolérance aux antagonistes neuro-hormonaux
- Besoin croissant de diurétiques
- Symptomatique malgré la CRT
- Dépendance aux inotropes
- Faible pic de VO₂ (<14-16) (consommation d'oxygène)
- Dysfonctionnement des organes lié à un faible débit cardiaque

Cependant, plusieurs contre-indications absolues sont à respecter⁴ dont :

- Maladie hépatique irréversible
- Maladie rénale irréversible
- Maladie neurologique irréversible
- Non-observance médicale
- Limitations psychosociales graves

Mais aussi des contre-indications Relatives :

- Âge >80 ans pour la destination therapy

- Obésité ou malnutrition
- Maladie musculosquelettique qui entrave la rééducation
- Infection systémique active ou intubation prolongée
- Tumeur maligne non traitée
- Maladie périphériques vasculaires sévère
- Toxicomanie active
- Fonction cognitive altérée
- Trouble psychiatrique non géré
- Absence de soutien social

Les ACM de longues de durées sont nommées en fonction de l'assistance qu'elles procurent :

- LVAD : Left Ventricular Assist Device, un dispositif d'assistance implanté sur le ventricule gauche
- RVAD : Right Ventricular Assist Device, un dispositif d'assistance implanté sur le ventricule droit
- BiVAD : Biventricular Assist Device, un/des dispositifs d'assistance implantés sur les deux ventricules
- TAH : Total Artificial Heart, un dispositif remplaçant totalement le cœur

La durée de l'implantation de ces dispositifs dépend de l'option thérapeutique choisie pour les patients implantés :

- BTR : Bridge to recovery, c'est une option choisie pour les cas de défaillance circulatoire aiguë, qui permet de réduire la pression et le volume sanguin dans les

ventricules, leur permettant de récupérer leur fonction après un certain temps d'implantation dans certaines conditions favorables.

- BTB : Bridge to bridge, cette option est utilisée dans le cas où le patient est dans un état trop défavorable pour une opération lourde, comme un choc cardiogénique. Cette thérapie permet de stabiliser hémodynamiquement le patient pour le préparer pour une ACM de plus longue durée.
- BTT : Bridge to transplantation, cette option est utilisée pour permettre à des patients sur liste d'attente pour une transplantation d'un cœur de les stabiliser hémodynamiquement.
- DT : Destination therapy, cette option est une alternative à la greffe, comme indiqué, la transplantation de l'ACM est pour une durée indéterminée. Elle est utilisée pour les patients ne pouvant être éligible pour une greffe cardiaque. Etant dans un contexte où la liste des demandeurs de greffes s'allonge au fur et à mesure de l'augmentation de la survie des patients en IC, cette solution gagne de plus en plus de terrain par rapport à l'option BTT⁸, bien qu'il n'y ait pas de position claire sur le meilleur choix entre DT ou BTT⁹.

D'après plusieurs études⁸⁻¹⁰, il n'y a pas de différence de survivabilité après une année d'implantation entre les DT et les BTT pour les implantations avec un ACM de type LVAD, de même en comparaison à court et moyen termes (entre 2 et 5 ans) avec une transplantation cardiaque, mais pour le plus long terme, la transplantation cardiaque reste la solution privilégiée pour une survivabilité à long terme⁸.

Néanmoins, la trop forte demande de transplantation rend cette solution inenvisageable par rapport au nombre de donneur, rendant la nécessité de développer de nouveaux dispositifs plus performants nécessaires pour le futur.

1.2. Les assistances ventriculaires

Les assistances ventriculaires (VAD) s'implantent, elles, en dérivation par rapport au cœur (voir figure 1). Le sang afflue dans le dispositif par un canal connecté à la base du ventricule gauche, pour ensuite entrer dans la chambre de pompage prothétique. Le sang est par la suite propulsé par un autre canal vers l'artère aorte, pour finalement retourner dans le système circulatoire. Reporté en 1963 par les docteurs Liotta et Crawford, la première utilisation clinique de VAD a été réalisée via une thoracotomie. L'assistance intracorporelle avec une pompe pneumatique a été implantée en utilisant l'entrée de l'oreillette gauche et la sortie de l'aorte thoracique descendante. Malgré la réussite de l'opération, le patient décèdera malheureusement le jour d'après¹¹. Les VADs ont ensuite été utilisées en BTR ou en BTT, mais la plus grande avancée dans ce domaine est arrivée avec le VAD de Thoratec®, une assistance à pompe pneumatique dont, malgré les années et les évolutions du dispositif, la structure basique de la machine est encore utilisée à ce jour en clinique¹².

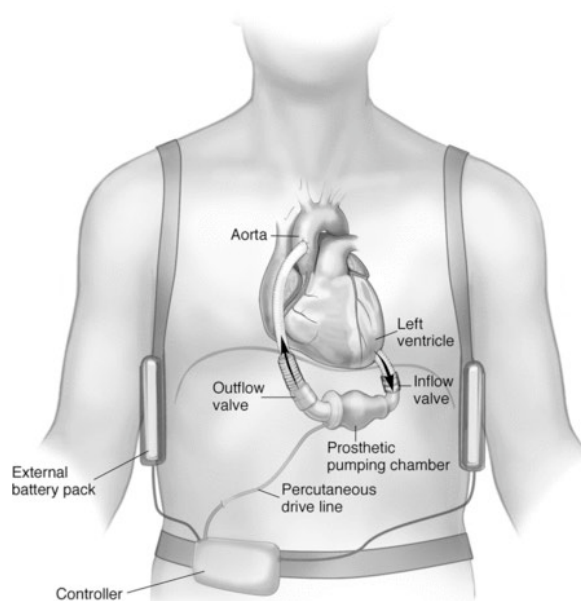


Figure 1 : schéma représentatif d'un dispositif LVAD en place dans un patient¹³.

La première VAD de Thoratec® a été implantée dans une série de patients en BTT et BTR, les principaux événements indésirables étant des complications hémorragiques (31-

45%), des évènements thromboemboliques (8%) et des infections liées au dispositif (18%). 12 des 44 patients en BTR étaient en rémission, et 39 des 67 patients en BTT ont eu une transplantation cardiaque¹⁴. Le thoratec paracorporel VAD (PVAD) est le successeur direct de ce dispositif et a été également approuvé en BTT et BTR.

Ces premiers dispositifs étaient à flux pulsatiles, car à l'époque, cet élément semblait nécessaire à la rémission et au fonctionnement du cœur implanté. Toutefois, des études sur la continuité du flux par rapport à la pulsatilité ont depuis démontré que la pulsatilité n'était pas nécessaire pour la rémission des organes^{15,16}. Les innovations du dispositif l'ont donc fait passer d'une pompe à énergie pneumatique vers une pompe électrique, offrant aux patients avec une assistance à flux continu une nette amélioration de leur qualité de vie^{17,18}.

En 2019, 3198 nouveaux patients ont été implantés avec un LVAD¹⁹ ce qui est un record d'implantation annuelle de LVAD, les derniers chiffres transmis datent de 2021, de 2012 à 2021, le nombre de patient implanté avec un LVAD est de 27 314, avec 2464 LVAD implanté pour cette année-ci²⁰. En 2020 la société des chirurgiens thoraciques affiliée à l'Intermacs a déclaré 25 551 patients implantés avec un LVAD à flux continu entre 2010 et 2019. Les patients reçoivent actuellement (Figure 2) les dernières générations de LVAD à flux continu équipée d'une pompe électro-magnétique, remplaçant ainsi les LVAD à flux continu axiales.

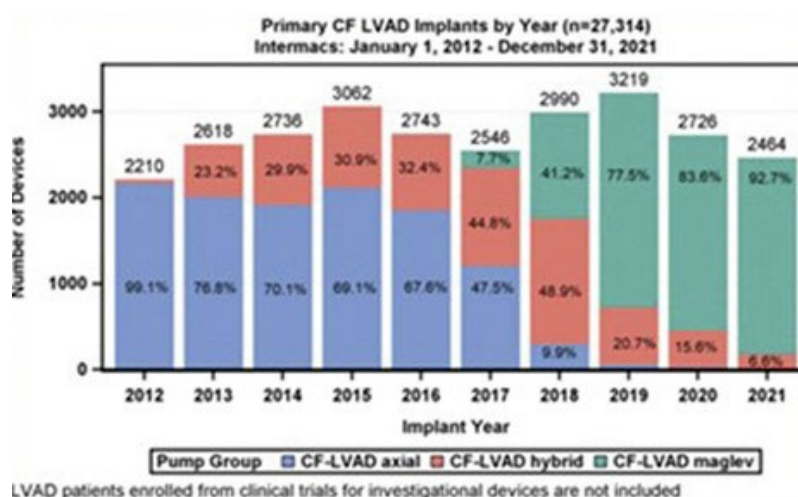


Figure 2 : Récapitulatif des implantation LVAD des 10 dernières années dans la base de donnée intermacs²⁰

HeartMate II

Commercialisé par Thoratec, une société spécialisée dans les assistances circulatoires, son premier produit était le Thoratec VAD system, qui avait reçu l'autorisation de la Food & Drug Administration (FDA) en 1995.

Elle avait commercialisé, après la fusion avec Thermo Cardiosystems, le dispositif HeartMate VE, qui a reçu en 2002 l'approbation de la FDA pour les implantations de patients en BTT et DT. Ces dispositifs, de première génération, possédaient un flux pulsatile.

HeartMate II est le LVAD le plus implanté dans le monde et fait partie de la deuxième génération des LVAD avec un flux continu et une pompe axiale (figure 3) de 40x60mm de diamètre et pesant 375g.

Le dispositif est actionné par un moteur brushless (sans frottement) alimenté par électricité et d'une durée de vie de 5 ans. Sa vitesse de rotation est comprise entre 6000 et 15000 tour/min, avec un débit basal approprié pour l'hémodynamique de 9000 tour/min²¹.

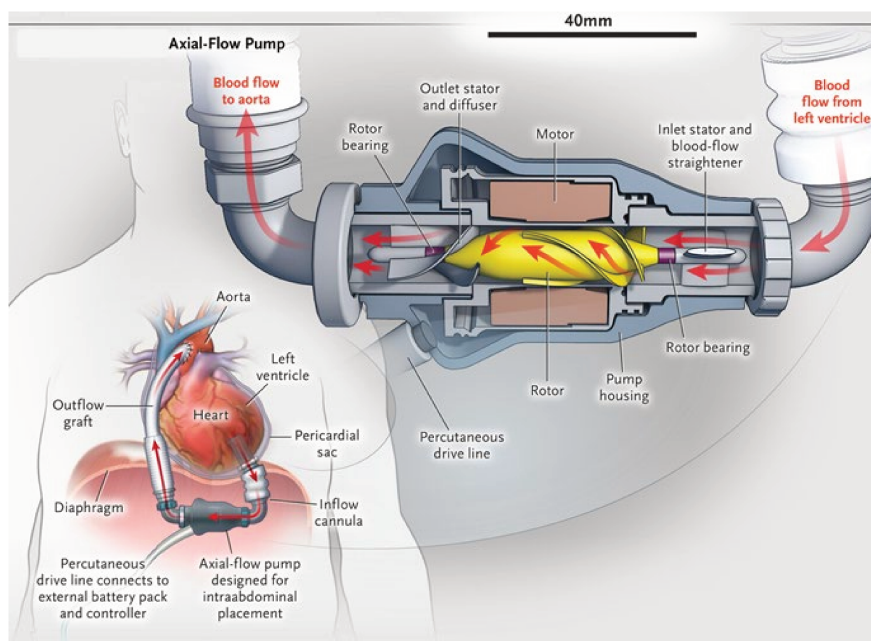


Figure 3 : Schéma de fonctionnement d'un Heartmate II²²

HeartMate II a obtenu l'approbation de la FDA en BTT en 2008, les premiers résultats après 18 mois de suivis de patients implanté dans l'étude pivot montraient déjà des résultats probants, une amélioration de la survivabilité des patients, moins d'évènements indésirables et une plus grande fiabilité par rapport aux anciens modèles à flux pulsatile²³. Ces résultats, en plus d'autres essais²⁴ ont alors permis de servir de base pour la FDA qui donne encore son approbation pour proposer les dispositifs HeartMate II en DT et non seulement en BTT. En Europe, HeartMate II acquiert le marquage CE en 2005 aussi bien pour les implantations BTT que DT. Les patients implantés avec HeartMate II montraient des améliorations des symptômes d'IC, leur faisant réduire leur classe NYHA en passant de classe III/IV aux classes I/II en 6 mois d'implantation et conservaient cette amélioration de leur état de santé pendant 2 ans. Malheureusement, cette technologie apporte aussi de nouveaux problèmes liés à l'hémostase, dus à la faible hémocompatibilité du dispositif, qui seront développés plus tard en 1.3. Pour combler ces défauts, les patients sont soumis à des traitements antithrombotique comme l'aspirine et la warfarine jusqu'à atteindre un INR thérapeutique. Afin de tenter de réduire ces problèmes d'hémocompatibilité, un nouveau type de dispositif est alors produit et proposé aux patients.

HeartMate 3

Cette assistance est la troisième génération des dispositifs LVAD, développé dans les années 2000. La pompe se fait par force centrifuge en flux continue, son design magnéto-lévitaiton (MagLev) (figure 4) minimise le contact entre les composants mobiles, ce qui peut réduire l'usure et le potentiel de formation de caillots sanguins, un problème fréquent avec les versions antérieures impactant l'hémocompatibilité de la machine. Ce dispositif est également capable de produire artificiellement un pseudo-flux pulsatile en variant sa vitesse de rotation 30 fois par minutes²⁵. Ses dimensions sont $\varnothing 50 \times 50$ mm pour un poids de 200g, elle a une vitesse de rotation allant de 3000 à 9000 tr/min, la pulsation artificielle qu'elle peut générer se fait par des sauts de 2000 tr/min dans un cycle de 2 secondes : augmentation de la vitesse durant 0,2 seconde, puis diminution de 2000 tr/min durant 0,15 seconde²⁶.

La paroi interne du dispositif est texturée par des microsphères de titane pour permettre l'adhésion de cellules de patients, le titane étant un métal choisi pour sa haute résistance à la corrosion. Très répandu dans les prothèses, il se veut un matériau fiable avec de bonnes propriétés mécaniques. La fixation des cellules au titane n'est pas liée aux propriétés chimiques du métal, mais bien à la forme du revêtement texturé, les microsphères semblant optimiser l'adhésion de cellules endothéliales²⁶ à celui-ci. Des études plus récentes sur ce point précis montrent que des revêtements avec une précision au nanomètre améliorent cette adhésion, mais qu'elle n'est pas encore suffisante. Dans l'optique d'obtenir une meilleure adhésion, l'association notamment du titane avec un composant comme du carbone amorphe hydrogéné donne à ce jour des résultats prometteurs dans ce domaine²⁷. HeartMate 3 obtient le marquage CE en 2015 en BTT et DT puis en 2017, il obtient l'approbation de la FDA pour une implantation en BTT. L'année suivante, en 2018, il l'acquiert aussi pour les implantations en DT. L'essai clinique positif MOMENTUM 3 a conduit à cette décision et a permis de remplacer HeartMate II par cette troisième génération plus performante. C'est en 2016 que débute une étude multicentrique (69 centres participants), évaluant le nouvel appareil en le comparant avec son prédécesseur sur 366 patients randomisés en implantation BTT et DT sur une durée de 2 ans²⁸. Le tableau 4 résume les principaux effets indésirables qui ont été observés sur ce nouveau modèle.

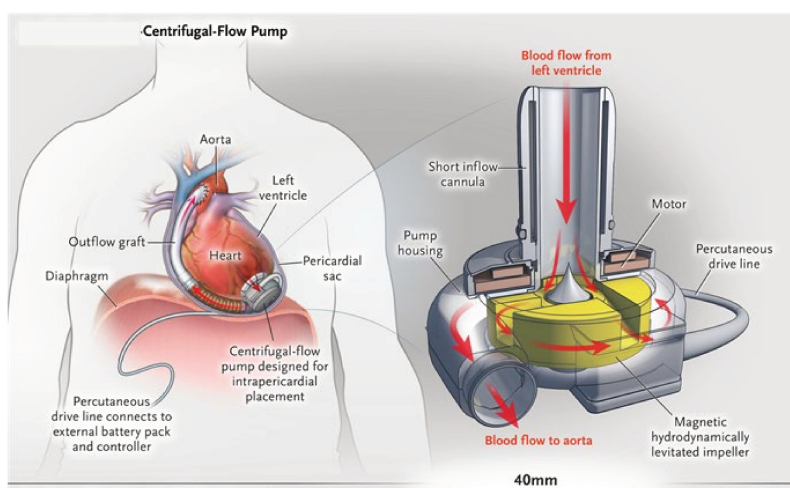


Figure 4 : Schéma de fonctionnement d'un HeartMate 3²²

Effets indésirables	HeartMate 3 (n=189)	HeartMate II (n=172)	Valeur p
Thrombose de pompe suspectée/confirmée	2	27	<0,001
Thrombose de pompe ayant conduit à une réopération/retrait du dispositif	0	21	<0,001
Arrêt Vasculaire Cérébral ischémique/hémorragique	19	33	0,02
Hémorragie conduisant à une opération	23	30	0,18
Hémorragie gastrointestinal	51	47	1,00
Infection du cordon d'alimentation	45	34	0,37
Sepsis	26	28	1,00
Insuffisance cardiaque droite	60	48	0,49

Tableau 4 : Comparaison des effets indésirables entre HeartMate 3 et HeartMate II observés dans l'étude MOMENTUM3²⁸

L'étude clinique a démontré qu'il y avait des améliorations en termes de thrombose de pompe ainsi qu'une diminution des accidents vasculaires chez les patients implantés avec un HeartMate 3. Néanmoins, les autres défauts déjà présents sur le précédent modèle (infection du câble d'alimentation, sepsis, insuffisance cardiaque et les hémorragies) restent des événements récurrents chez les patients implantés avec les deux dispositifs étudiés. Parmi les 366 patients, le taux des patients sans AVC ou sans nécessité de réopération est de 77.9% pour les patients implantés avec HeartMate 3, contre 56.4% pour ceux ayant reçu HeartMate II pendant les deux années de l'étude²⁸. Plusieurs études ont constaté une augmentation de la survie après 1 an d'implantation des patients en BTT (86.6%) et DT (80.9%) entre 2015-2019 a augmenté dans cette période comparé à la survie après 1 an dans la période 2010-2014. De plus cette tendance est aussi observée pour les patients implantés pendant 2 ans avec les nouveaux dispositifs LVAD. En effet, les taux de survie des patients implantés 1 ou 2 ans durant l'ère 2015-2019 (HeartMate3), comparé à l'ère 2010-2014 (HeartMate II) ont augmenté, 82.3% et 73.1% contre 80.5% et 69.1% respectivement^{19,29}.

Cœur artificiel total

Les cœurs artificiels totaux sont un autre type de MCS qui remplacent les ventricules de l'hôte. Pendant l'opération, le patient est mis sous Circulation Extracorporelle (CEC) en dérivant depuis l'artère aorte ascendante vers les veines caves inférieures et supérieures. Une fois la CEC mise en route, le chirurgien procède à l'exérèse des ventricules. Les valvules mitrales et tricuspides sont conservées, et les excès de muscles et de tissus sont coupés pour préparer l'anastomose. Cette dernière se fait avec la suture de la collerette auriculaire placée à la future jonction auriculo-ventriculaire prothétique. L'anastomose des artères est réalisée en suturant les artères avec les conduites d'éjection. Enfin, le cœur artificiel est installé sur les collerettes et les anastomoses. Aujourd'hui, peu de cœurs artificiels sont représentés sur le marché. Seuls Syncardia et Aeson sont proposés comme traitement à l'IC en BTT pour Aeson et BTT et DT pour Syncardia. D'autres dispositifs sont encore en phase d'essai, tels que le ReinHeart® TAH, développé par Reinheart TAH GmbH, à l'université d'Aachen en Allemagne, ou encore le RealHeart® V11C TAH développé en Suède par Scandinavian Real Heart. Le ReinHeart TAH est un dispositif remplaçant les ventricules de l'hôte et fonctionnant avec une pompe à piston électromagnétique. Le piston est enclenché passivement par la pression sanguine de l'hôte, puis le piston alimenté électriquement permet d'enclencher la pompe électromagnétique, créant ainsi le flux sanguin³⁰. Cette pompe permet d'améliorer la durabilité du dispositif car cette combinaison de bobine mobile et de piston linéaire est un concept simple réduisant la nécessité d'autres matériaux et donc augmentant la durabilité. Auparavant le dispositif avait une taille de 87x90 mm pour un poids de 923g. Le débit maximal était de 7 L/min chez le veau avec une fréquence de 120 bpm et une pression aortique de 120/80 mmHg. Depuis 2022, une version réduite du ReinHeart a été développée, réduisant la taille du dispositif : 79x83mm avec un volume réduit de 20 ce qui a conduit à augmenter la fréquence cardiaque, en passant à 145 bpm pour avoir un débit moyen de 5 L/min. La raison de cette réduction de taille est d'avoir la possibilité d'être implantable sur une plus large proportion de patients³¹. Ce dispositif est toujours en phase pré-clinique.

Un autre dispositif est développé en Suède, le RealHeart®, un TAH à 4 compartiments remplaçant les oreillettes et les ventricules de l'hôte. La coque extérieure est en polyéthéréthercétone (PEEK). Les valves sont des valves bicuspides synthétiques en carbone pyrolytique On-X® (Artivion, Kennesaw, United States). Les premiers tests montrent un débit maximal de 30 L/min avec une fréquence maximale de 120 bpm. Sa pression aortique peut aller de 25 à 50 mmHg³².

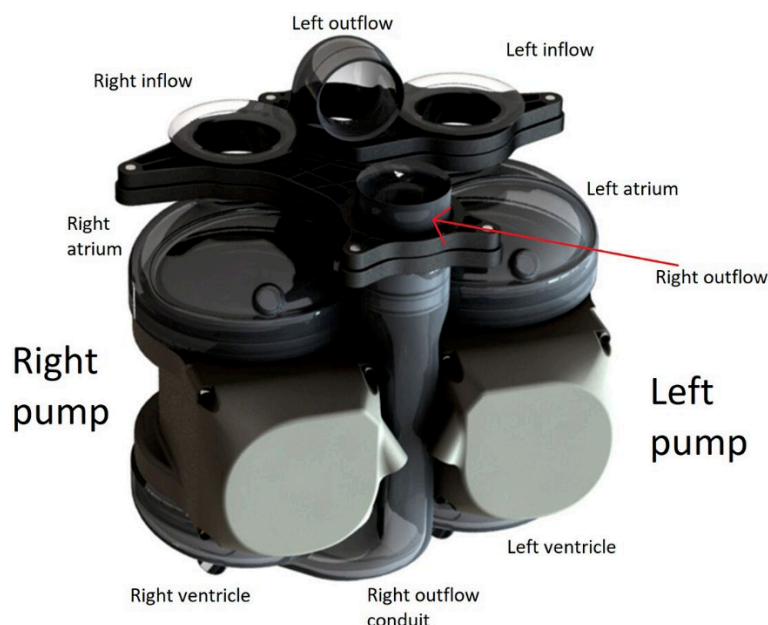


Figure 5 : Schéma d'un RealHeart³² de ScandinavianReal Heart.

La pompe se fait par un système de pression/dépression des différentes chambres. Pendant la diastole ventriculaire, le sang s'écoule de l'oreillette artificielle à travers le cylindre du plan auriculo-ventriculaire (AV). La valve mitrale/tricuspide est ouverte, tandis que le plan AV se déplace vers le haut en direction de l'oreillette. À la fin de la systole ventriculaire, le cylindre AV est en position basse et la valve mitrale/tricuspide est fermée en raison de l'augmentation de la pression dans le ventricule artificiel. L'augmentation de la pression pendant la systole a également ouvert la valve aortique/de l'artère pulmonaire et le sang s'écoule par le flux de sortie. L'oreillette artificielle reste ouverte et se remplit pendant la systole ventriculaire.

Les premières études *in silico* et *In vitro* avec du sang de porc³³ sont publiées en 2023 avec des résultats prometteurs mais reste encore en développement³⁴

Syncardia

Les cœurs artificiels sont très peu représentés sur le marché. Seuls Syncardia et Aeson sont aujourd'hui proposés en tant que cœurs artificiels totaux.

Ces prothèses ont une pompe pulsatile pour mimer la fonction cardiaque. Syncardia est une prothèse qui est passée par plusieurs évolutions depuis les années 80, mais l'histoire des cœurs artificiels totaux remonte jusqu'à avant la seconde guerre mondiale. En 1937, le docteur Vladimir P. Demikhov a développé un cœur artificiel total qu'il a ensuite implanté dans un chien en exécutant la première implantation intrathoracique au monde³⁵. La machine, qui était trop grosse pour être installée dans le corps du chien, pouvait rester en fonction pendant 5 heures et représente le premier cas de circulation cardiaque maintenu après l'excision du cœur^{35,36}. D'autres appareils ont été ensuite développés, la machine cœur-poumon par le docteur Gibbon en 1939, testé sur des rats³⁷ puis plus tard sur des jeunes enfants. Le succès ne sera néanmoins pas au rendez-vous car les premiers bénéficiaires en 1952 et en 1953 n'ont pas survécu à l'opération. Cela a néanmoins permis de mieux comprendre la génération de thrombus, ce qui a conduit à l'oxygénateur type Mayo-Gibbon et a pavé le chemin vers le développement des appareils CECs^{37,38}. De même pour un étudiant en thèse à l'université de Yale, le futur docteur en médecine William Sewell en 1948. Ce dernier a eu l'idée de développer un cœur artificiel à pompe pneumatique pour sa thèse de médecine³⁹ (figure 6).

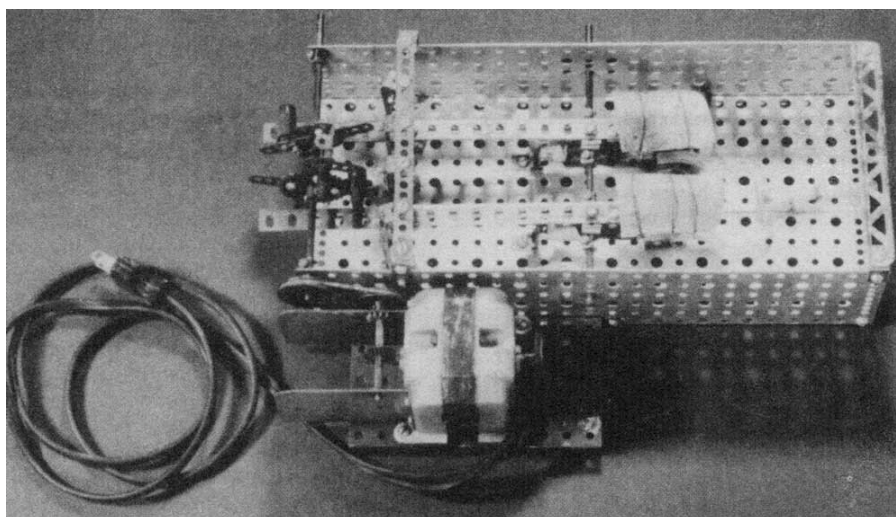


Figure 6 : photographie du dispositif de Sewell, une pompe cardiaque by-passant le ventricule droit du cœur d'un chien.

En 1963, sous l'impulsion du Congrès Américain, la recherche sur les cœur artificiels totaux a connu un gain d'intérêt significatif. Néanmoins, les premiers retours des études montrent les premiers obstacles à franchir (et qui sont toujours d'actualité) : problème d'hémocompatibilité, ajustement des traitements aux besoins physiologique des patients, des problèmes de miniaturisation, d'alimentation transportable et de produire des assistances fiables sur le long terme⁴⁰. Le premier cœur artificiel total, nommé Liotta-Heart, a été implanté en 1969 par le docteur Denton Cooley à Houston, aux Etats-Unis. Le patient, un homme âgé de 47 ans, a été implanté en bridge to transplantation pendant 65h en attendant une implantation cardiaque (figure 7). Cette prothèse, a été inventé par le chirurgien argentin Domingo Liotta, recruté au Baylor College of Medecin à Houston par le docteur Michael DeBarkey, qui a été le premier médecin a implanter une pompe cardiaque externe comme pontage aorto-coronarien du ventricule gauche en 1966 sur un patient. Le patient de 47 ans a donc été transplanté avec le cœur d'un donneur après 3 jours de support avec le TAH Liotta-heart. Cette opération a été un succès car elle démontrait la faisabilité d'une opération bridge to transplantation avec une circulation mécanique⁴¹.

Cooley et al.

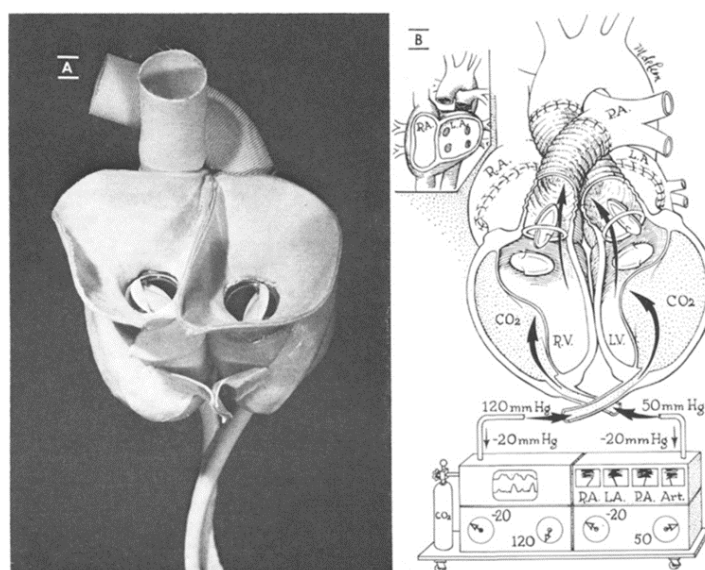


Figure 7 : Liotta TAH, A, photographie de la prothèse cardiaque ; B diagramme montrant la technique d'implantation et la méthode d'activation des unités de pompage alternatif du système pneumatique extracorporel. Art. = artériel ; L.A. = atrium gauche ; P.A. = artère pulmonaire ; R.A. = atrium droit ; R.V. = ventricule gauche

Jarvik-7 est le principal cœur artificiel des années 1980, c'est avec ce dispositif que les premières implantations en destination therapy ont été effectuées. Le patient implanté le plus durablement est monsieur Schroeder, en 1985, avec un support de 620 jours. Le patient était capable de se déplacer, mais il a souffert de nombreuses complications dont des AVC et des infections, puis finira par décéder d'une infection pulmonaire⁴². Les patients implantés étaient hémodynamiquement stables mais beaucoup souffraient d'hémorragies, d'AVC et/ou de septicémie. Un des problèmes majeurs de la prothèse était sa source d'énergie, car la plupart devaient rester attachés à un générateur pour alimenter l'assistance, ce qui obligeait les patients à rester à l'hôpital. Ses valves mécaniques obligent également la prise de fortes doses d'anticoagulants oraux pour contrer les effets coagulants des valves mécaniques. Le dispositif pouvait aussi provoquer des soubresauts auprès des patients à chaque battement⁴¹. Suite à des conflits avec la FDA, l'agence fit fermer Symbion inc opération en 1990, qui a alors transféré ses droits et ses brevets vers Cardiowest Technologies Inc., rebaptisant le Jarvik-7 en Cardiowest. Cardiowest technologies reçoit l'autorisation de conduire des tests cliniques en 1993 sur 5 centres aux Etats-Unis en bridge to transplantation. La technologie n'a pas évolué entre le Jarvik-7 miniaturisé, développé pour les femmes et personnes de petites taille, et le Cardiowest Heart. Les résultats du Cardiowest Heart étaient concluants, après une étude de 10 ans, le dispositif a été implanté dans 95 patients et 79% des bridges to transplant sont réussies (en incluant les transplantations avec un cœur de donneur) avec des taux de survies pour 1 an de support de 70%, 50% pour 5 ans de support et 45% pour 8 ans de support. En 1997, Cardiowest Heart reçoit le marquage CE pour son utilisation en Europe, puis en 2003, la compagnie Cardiowest, inc. est rachetée pour devenir Syncardia, inc. Le cœur artificiel change alors également de nom pour devenir SynCardia CardioWest™ Total Artificial Heart.

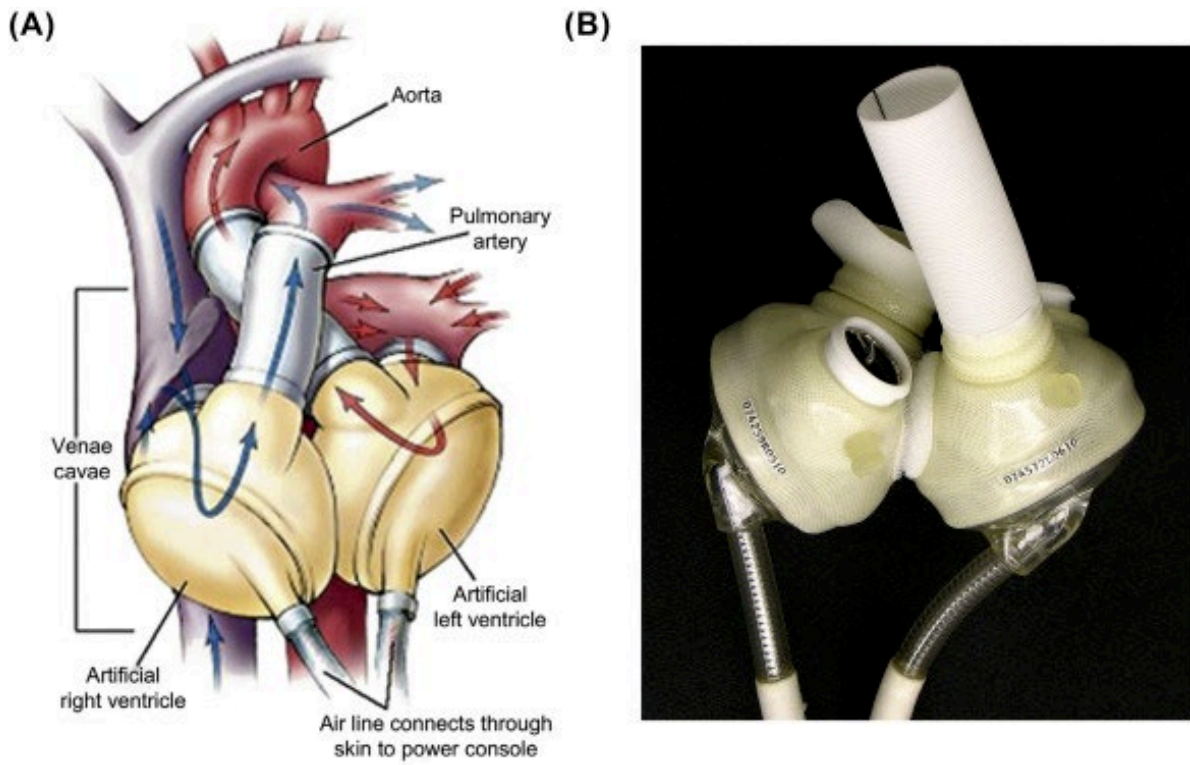


Figure 8 : A, Diagramme de Syncardia Cardiowest Total Artificial Heart en condition de fonctionnement. La connection entre les pompes pneumatiques et les oreillettes et la circulation sanguine se fait par un conduit en dacron. B, Photo d'un cœur artificiel total Syncardia

1.3. Aeson

Historique de l'entreprise et de la Bioprothèse

Le cœur artificiel bioprothétique total Aeson est le dispositif mis au point par Carmat depuis sa création en 2008. Il a été baptisé ainsi depuis 2020 après avoir obtenu son marquage CE pour sa mise en vente en Europe. La prothèse obtient également l'approbation de la FDA pour une utilisation sur le territoire des Etats-Unis⁴³. Cette bioprothèse est le fruit de plusieurs années d'études pré-clinique et de différentes études qui auront permis d'améliorer le dispositif. Voici un historique et les dates clés :

- 2008 : Fondation de la société Carmat. Elle est née de l'association de deux personnes en 1990 : le professeur Alain Carpentier, éminent chirurgien cardiaque ayant contribué au développement de valves bioprothétiques, et Jean-Luc Lagardère, président de la société Matra Défense, société développant du matériel électronique pour l'armée de l'air et la marine.
- 2009 : Carmat obtient une subvention de 33 millions d'euros pour aide au développement par la banque BPI France et la Commission Européenne jusqu'à l'obtention du marquage CE
- 2010 : Carmat devient une société anonyme SA, ce statut permettant d'entrer en bourse dans le marché Alternext. L'entrée en bourse permettra de générer des fonds pour les essais cliniques. Depuis plusieurs lever de fonds ont été fait. En 2010, l'introduction en bourse de Carmat SA génère 16 millions d'euros.
- 2011 : Carmat génère un capital de 29,3 Millions d'euros. Création d'un dossier auprès de l'ANSM pour à terme lancer des essais cliniques.
- 2012 : Essais précliniques sur des veaux. Les résultats sont concluants pour la bioprothèse et des implantations chez l'homme pourront être effectuée.^{44,45}

- 2013 : Première implantation d'un cœur artificiel total chez l'homme⁴⁶. Le patient était un homme âgé de 76 ans avec une défaillance bi-ventriculaire. La condition du patient empirait malgré les traitements médicamenteux, ce qui avait conduit à de multiples ré-hospitalisation. Le patient a été implanté pendant 76 jours et est subitement décédé à cause d'une défaillance d'une pièce électronique du dispositif.
- 2014-2016 : La première étude du dispositif, l'étude de faisabilité est lancée durant cette période. Quatre patients sont implantés durant cette période avec succès. Ces derniers étaient tous des hommes âgés de 76, 68, 74 and 58 ans, pendant une durée de 74, 270, 254 et 20 jours respectivement. Les dispositifs étaient réglés manuellement en fonction de l'activité cardiaque des patients⁴⁷.
- 2016 : Carmat lève 50 millions d'euros via une opération de placement privé, avec le soutien de nouveaux investisseurs et d'investisseurs historiques. Les procédures pour l'obtention du marquage CE sont initiées. Une nouvelle étude débute : l'étude PIVOT. Un premier patient est inclus dans l'étude.
- 2017 : Carmat génère 53 millions d'euros grâce a une levée de fond ouverte au public. De nouveaux centres s'ouvrent à l'internationale pour l'étude PIVOT (République tchèque et Kazakhstan), 3 nouveaux patients sont inclus dans l'étude PIVOT, montant à 4 patients.
- 2018 : Carmat reçoit 30 millions d'euros sous conditions de la banque européenne d'investissement. Ces conditions sont de finaliser ses essais cliniques, d'assurer la transition de l'entreprise Carmat vers une entreprise industrielle et commerciale et d'augmenter ses capacités de productions. 7 nouveaux patients sont inclus dans l'étude PIVOT, montant à 11 patients. En fin d'année 2018, la production des assistance circulatoires est interrompue pendant 6 mois.
- 2019 : Carmat lève 60 millions d'euros via des voies de placement privé et de certains actionnaires historiques. 1 nouveau patient ajouté à l'essai clinique PIVOT, 12 patients au total. Reprise de production des cœurs artificiels en mai 2019.

- 2020 : Un financement est attribué à Carmat en octobre 2020 à hauteur de 13 millions d'euros par Les Fonds National de l'Innovation pour mener une étude exclusivement en France. Un Prêt Garantie par l'Etat de 10 millions d'euros est également octroyé. Carmat obtient l'approbation de la FDA pour débiter des essais cliniques de faisabilité aux Etats-Unis 05 février 2020. 3 nouveaux patients sont ajoutés à l'étude de faisabilité portant le nombre de patients inclus dans l'étude PIVOT à 15.
- 2021 : Dans le cadre d'une augmentation de capital pour le lancement commercial du cœur artificiel Aeson, Carmat génère 55.7 millions d'euros. Le premier patient implanté à titre commercial se fera en juillet 2021, à l'hôpital de Naples, en Italie. Une autre implantation est prévue en Allemagne, dans le centre médical universitaire du Schleswig-Holstein à Kiel en août. 2 nouveaux patients sont inclus dans l'étude de faisabilité PIVOT, élevant le nombre de patients inclus à 17. Pour l'étude de faisabilité des USA, les trois premiers patients sont inclus dans l'essai clinique.
- 2022 : Une première levée de fond est réalisée en avril 2022, atteignant la somme de 31.1 millions d'euros. Un financement mixte est octroyé à Carmat en décembre 2022 à hauteur de 17 millions d'euros en tant que lauréat du Conseil Européen afin d'intégrer son programme d'accélération : Accélérateur du conseil européen de l'innovation. L'essai clinique française EFICAS débute, le premier patient inclus dans l'étude est implanté en décembre 2022.
- Courant année 2023 : Carmat se voit octroyer un financement non dilutif en avril 2023 à hauteur de 13.2 millions d'euros dans le cadre du programme « France 2030 » pour augmenter la capacité de production de la société. 2 nouveaux patients sont inclus dans l'étude EFICAS, montant à 3 le nombre de patients inclus dans l'étude française.

Les essais cliniques

Plusieurs études cliniques ont été réalisées dont la plupart sont en cours actuellement pour le cœur artificiel bioprothétique de Carmat. La phase de faisabilité est une étude menée en France entre 2014 et 2016. A la fin de cette dernière, l'étude PIVOT est initiée, elle est encore en cours en 2023.

L'étude de faisabilité aux Etats-Unis est la troisième étude de Carmat, elle n'inclut que des patients dans les centres des Etats-Unis. Une quatrième étude est en cours depuis 2022, l'étude EFICAS, également en cours actuellement :

	Patients inclus / total prévu	Objectifs	Statut
Etude de faisabilité	4/4	Vérifier la sécurité Exploration des principales performances Survie à 30 jours	Complétée
Etude PIVOT	17/20	Valider la sécurité Valider les performances systèmes Survie à 180 jours ou transplantation dans les 180 jours post-transplantation.	En cours
Etude de faisabilité US	3/10	Survie des patients après 180 jours de support Patient sans accident vasculaire cérébral invalidant pendant le support Amélioration du statut fonctionnel par le test de 6	En cours

		minutes de marche Transplantation dans les 180 jours suivant l'implantation	
Etude EFICAS	3/52	Survie des patients après 180 jours de support Patient sans accident vasculaire cérébral invalidant pendant le support Transplantation dans les 180 jours suivant l'implantation	En cours

Tableau 5 : Tableau de synthèse des essais cliniques de Carmat

Critères d'éligibilités :

Les critères d'éligibilité sont nombreux. Dans un premier temps, il est nécessaire d'être majeur. Comme base, la majorité en France, c'est-à-dire 18 ans, a été choisie, même pour des études à l'étranger avec un âge de majorité différent, comme aux États-Unis, par exemple. Un patient de n'importe quel sexe est autorisé à participer à l'étude. Les patients inclus devront se situer dans les catégories INTERMACS 2 et 3, relativement stables, pour être inclus. Voici la liste des autres critères inclusifs et exclusifs qu'il est nécessaire de remplir pour participer à l'étude.

Critères d'inclusion :

- Une compatibilité anatomique avec le dispositif doit avoir été confirmé par des scans de tomodensitométrie
- Inotrope dépendant ou avec un index cardiaque < 2.2L/min/m² si les traitements inotropes sont contraindiqués pour le patient

- Le patient a obtenu un management médical optimal basé sur les recommandations de l'ESC/AHA pour le traitement des insuffisances cardiaques
- Être éligible pour un traitement pour un assistance mécanique circulatoire biventriculaire en accord avec les recommandations de l'ISHLT (the International Society of Heart and Lung Transplantation) à savoir :
 - Insuffisance biventriculaire avec au minimum deux des mesures échocardiographique/hémodynamique impliquant une insuffisance du ventricule droit : Fraction d'éjection du ventricule droit $\leq 30\%$; Right Ventricular Stroke Work Index (RVSWI) $\leq 0.25 \text{ mmHg} \times \text{L/m}^2$; Tricuspid Annular Plane Systolic Excursion (TAPSE) $\leq 14 \text{ mm}$; RV-to-LV end-diastolic diameter ratio > 0.72 ; Central Veinous Pressure (CVP) $> 15 \text{ mmHg}$; CVP-to-Pulmonary capillary wedge pressure (PCWP) ratio > 0.63 ; Tricuspid insufficiency grade 4 ; Pulmonary artery pulsatility index (PAPi) < 2
 - Tachycardie ventriculaire récurrente et soutenue réfractaire au traitement ou fibrillation ventriculaire en présence d'une cardiomyopathie arythmogène non traitable.
 - Insuffisance cardiaque due à une physiologie restrictive ou constrictive
- Le patient a signé le consentement éclairé, ayant compris toute la procédure et s'engage à respecter les exigences de l'étude.
- Le patient est éligible pour une transplantation cardiaque

Critères d'exclusion :

- Est connue pour une intolérance aux thérapies anticoagulant ou antiplaquettaire ou pour développer une thrombocytopénie induite par l'Héparine
- Est déjà implanté avec une assistance circulatoire mécanique non-temporaire
- Est implanté avec une assistance circulatoire mécanique Impella (de tout type) ou d'un ballon de contre-pulsion intra-aortique pendant plus de 21 jours
- Présence d'un ECMO pendant plus de 7 jours
- Le patient est intubé et inconscient, ou alors intubé et non réveillé
- Coagulopathie avec un taux plaquettaire $< 100\text{k}/\mu\text{L}$ ou bien avec un INR > 1.5 et non inuit par une thérapie anticoagulante
- AVC depuis moins de 3 mois, ou bien sténose carotidienne symptomatique ou connue avec plus de 80% de rétrécissement
- Anévrisme abdominal ou thoracique connue de plus de 5cm non traité
- Dysfonctionnement sévère d'organe avec les critères suivants
 - Bilirubine totale $> 2.5 \text{ mg/dL}$ ou cirrhose mis en évidence par ultrason, tomodynamométrie et biopsie positive
 - Un débit de filtration glomérulaire (DFG) $< 30\text{mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ ou bien la nécessité d'une thérapie de de remplacement rénal continu

- Le patient a un passé médical de bronchopneumopathie obstructive chronique avec un ratio volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) / capacité vitale forcée (CVF) <0.7, ou un VEMS prédits <50% ou encore une pneumopathie restrictive sévère
- Le patient a souffert récemment d'une septicémie (moins de 7 jours)
- Amylose AL ou amylose primitive observée
- Le patient présente une maladie vasculaire périphérique avec un indice bras-cheville <0.3
- Présence d'une maladie, autre qu'une maladie cardiaque, qui limiterait la survie à moins de 2 ans.
- Trouble cognitif irréversible, problèmes psychosociaux ou maladie psychiatrique susceptibles d'entraver le respect du protocole de l'étude et la gestion du cœur artificiel total qui, de l'avis de l'investigateur, pourraient interférer avec la capacité à gérer le traitement (par exemple, non-respect du traitement de l'insuffisance cardiaque, diabète non contrôlé, problèmes de santé mentale, etc.)
- Une grossesse en cours ou planifiée ou allaitement (les femmes en âge de procréer devront présenter un test de grossesse négatif).
- Le patient est actuellement inscrit ou a participé au cours des 30 derniers jours à une autre étude thérapeutique ou clinique interventionnelle susceptible de fausser les résultats de l'étude ou de l'affecter.

Un patient remplissant ces conditions pourra rejoindre les études cliniques de Carmat.

Etude de faisabilité (2014)

Une étude multicentrique portant sur 4 patients implantés avec un cœur artificiel total bioprothétique Carmat a été réalisée. Plusieurs objectifs étaient visés : évaluer la sécurité et les performances de la bioprothèse. Les patients souffraient d'insuffisance cardiaque bi-ventriculaire irréversible sans possibilité d'implantation cardiaque. Le taux de survie des patients implantés était de 50% durant les 6 mois de support, dont 75% de survie durant les 30 premiers jours de support. Le dispositif était en mode manuel, et tous les réglages hémodynamiques étaient préréglés en fonction des moyennes des patients implantés. L'étude a cumulé une durée d'implantation de 21 mois. Cette étude a permis de montrer que le dispositif avait une bonne compatibilité anatomique. De plus, c'est la première fois que le dispositif a permis le retour des patients 2 et 3 à leur domicile grâce au système portable. Les patients n'ont développé aucune hémorragie gastro-intestinale ou accident vasculaire cérébral. Ces résultats ont permis de lancer la troisième phase de l'étude clinique, l'étude PIVOT.^{48,49}

Etude PIVOT

Cette étude a pour objectif de soutenir le rapport d'évaluation clinique pour le marquage CE. Cette étude a pour objectif primaire la survie des patients à 6 mois (soit 180 jours) après implantation du cœur artificiel de Carmat, ou une greffe réalisée avec succès dans les 6 mois post implantation. Ce protocole vise à démontrer la sécurité et les performances de la bioprothèse chez les patients en insuffisance cardiaque biventriculaire non réversible. Les patients sélectionnés étaient classés dans les INTERMACS 3, donc dépendant aux inotropes. Plusieurs centres internationaux ont participé à l'étude, la France en 2016, le Kazakhstan et la République Tchèque en 2017, le Danemark en 2018, et les Pays-Bas en 2021. Le tableau 6 résume les résultats de performance du cœur artificiel Carmat en comparaison de ses concurrents Syncardia et HeartMate 3 en configuration BIVAD (BI-Ventriculaire Assist Device)⁵⁰⁻⁵³

Dispositif (patients)	Taux de survie à 6 mois	Accident vasculaire cérébrale	Saignement / réintervention	Saignement gastro-intestinal	Infection liée au câble percutané
Carmat Etude de Faisabilité (4 patients)	50%	0%	75%	0%	0%
Carmat Etude PIVOT (15 patients)	73%	0%	20%	0%	0%
Syncardia	54% - 63%	21% - 23%	15% - 41%	20%	22%
BIVAD (14 patients)	46% - 68%	7%	NA	7%	7%

Tableau 6 : Donnée intermédiaires Etude PIVOT, comparatif avec les implantations Syncardia et HeartMate 3

Cet essai clinique cumul 3100 jours de durée de support à ce jour. La plus longue durée d'implantation avec la bioprothèse est de 772 jours, un patient en destination therapy. Il reste encore 3 patients à inclure dans cette étude pour la clôturer.

Early Feasibility Study (EFS aux US)

C'est une étude multicentrique sur le territoire des Etats-Unis sur 10 patients. Cette étude est majeure car elle permettrait de procéder aux implantations commerciales sur le territoire des Etats-Unis. Une première cohorte de 3 patients a été recrutée, il reste encore 7 patients à inclure pour compléter l'étude. L'objectif primaire de cette étude est également la survie du patient à 6 mois post-implantation ou alors une transplantation est organisée et réalisée avec succès pour le patient au cours des 6 mois d'implantation. En cas de succès de l'étude, elle déboucherait sur une nouvelle étude PIVOT exclusive au territoire des Etats-Unis qui permettrait d'aboutir à une commercialisation du cœur artificiel total Aeson.

Etude EFICAS

Etude multicentrique sur le territoire français sur 52 patients. C'est un essai clinique exclusif à la France, le premier patient a été implanté à Lille par le professeur Vincentelli. Le CHRU de Lille est un des six centres participant avec deux centres à Paris : APHP GHU Pitié-Salpêtrière et Hôpital Européen Georges Pompidou, les hospices Civils de Lyon, et les CHU de Rennes et de Strasbourg. Comme pour les autres essais cliniques, l'objectif primaire est la survie du patient post-implantation à 6 mois, ou alors une transplantation réalisée dans ces délais et ce sans AVC.

Implantation commerciale

Les premières implantations commerciales ont débuté en 2021 à Naples, en Italie, avec des centres d'implantation en Allemagne. L'objectif est d'obtenir un suivi sur des patients implantés en bridge to transplantation, en décembre 2022, 5 patients étaient implantés en commerciale.

Durant tous ces essais cliniques jusqu'au modèles utilisés pour les implantations commerciales, les caractéristiques du TAH Aeson, c'est-à-dire son mode de fonctionnement et ses matériaux n'ont pas évolué, seul le design a évolué pour permettre une meilleure implantation dans le buste des patients.

Caractéristique du dispositif

Le cœur artificiel total Carmat est un dispositif d'assistance circulatoire, à pompe électrohydraulique et pulsatile biventriculaire. Tous les éléments sont incorporés dans le dispositif à l'exception de la batterie d'alimentation. Aeson imite la physiologie cardiaque naturel et est implanté dans le sac péricardique. L'hémocompatibilité est assurée par deux facteurs : pulsatilité du dispositif qui est capable de s'autoréguler⁵⁴⁻⁵⁶, et d'autre part par le choix des matériaux au contact du sang. Le cœur artificiel total consiste en deux ventricules artificiels qui remplacent les ventricules natifs, chaque ventricule comprend une partie supérieure rigide et une membrane mobile, la membrane hybride, permettant la création du flux sanguin grâce aux mouvements de l'huile siliconée. Deux pompes volumétriques

électrohydrauliques génèrent ce mouvement en provoquant les mouvements de l'huile susmentionnée, le mouvement se fait entre les ventricules droit et gauche, tirant et poussant les membranes hybrides. Ce mouvement de flux génère un rythme cardiaque avec une diastole et une systole, ce cycle cardiaque est de 2/3e diastole et 1/3e systole en condition standard de 5,4 L/min de volume d'éjection. Les pompes assurent toujours la vidange complète des cavités sanguines avec le flux sanguin, le but étant d'éviter la stase du sang et prévenir la formation de thrombus, tandis que les valves bioprothétiques en péricarde de bœuf d'entrée et de sortie assurent un flux sanguin unidirectionnel. Des capteurs de pression sont placés au centre de la membrane hybride de chaque ventricule permettent de mesurer durant le cycle la pression sanguine, les transducteurs ultrasoniques servent à mesurer la position des membranes hybrides (voir figure 9).

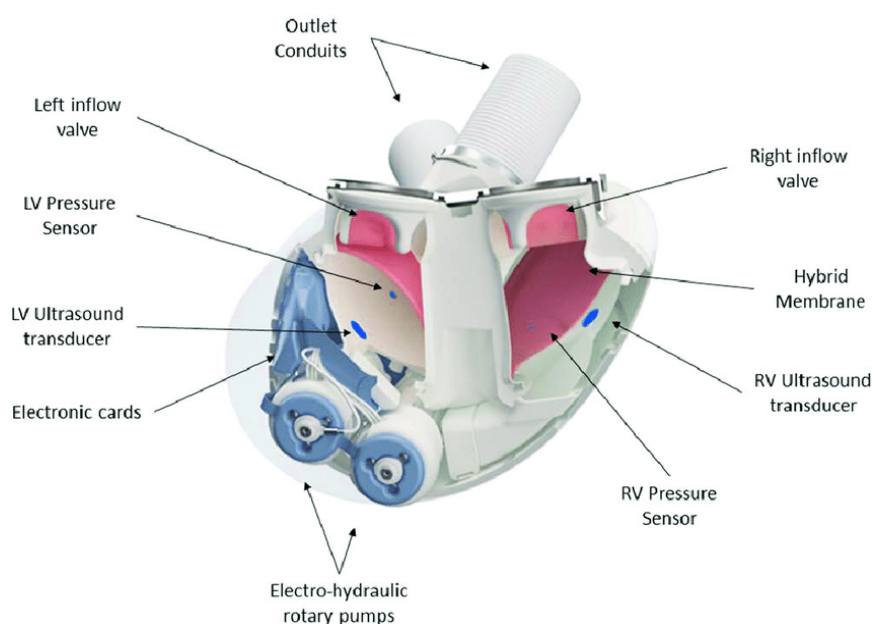


Figure 9 : Schéma du cœur artificiel total Aeson de Carmat, RV : ventricule droit, LV : ventricule gauche

La membrane hybride et les valves sont constitués d'un matériau bioprothétique, le péricarde bovin, afin de réduire potentiellement le besoin d'anticoagulation^{57,58}. La membrane hybride, ayant le rôle de séparateur des deux compartiments composant la cavité ventriculaire : le compartiment avec l'huile siliconé servant de fluide actionneur,

permettant le mouvement de pompe est en contact avec la face polyuréthane de la membrane hybride ; la cavité où le sang circule est en contact avec la face en péricarde bovin. Ce péricarde est prétraité avec du glutaraldéhyde, permettant de prémunir le collagène de la dénaturation mais aussi de masquer les antigènes bovins et ainsi réduire la réponse immunitaire de la part de l'hôte. La partie immobile de la cavité en contact avec le sang est recouverte de polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE), couramment utilisée en chirurgie vasculaire. Au moment de l'exérèse des ventricules du patient, les valves sont également retirées. Des valves bioprothétiques sont installées dans les entrées et les sorties des ventricules sont des valves Carpentier-Edwards (Edwards Lifesciences; Irvine, CA, USA). Les collerettes de suture faisant contact entre les oreillettes et le cœur artificiel Aeson sont également en péricarde bovin avec le même prétraitement en glutaraldéhyde. Les conduites d'éjection artérielles sont en Dacron. Les matériaux au contact avec le sang seront présentés plus en détails dans la partie suivante. L'énergie est fournie par des batteries lithium-ion pouvant être transportable (un jeu total de 8 batteries, dont 4 sont branchées directement au cœur artificiel total Aeson par un câble transcutané hautement flexible de 8 mm de diamètre. Un algorithme de contrôle prenant en compte les retours des capteurs de pressions et des transducteurs ultrasoniques et détermine la pression d'entrée et de sortie du flux sanguin dans le dispositif. Ces mesures permettent d'ajuster la fréquence cardiaque de la bioprothèse pour répondre aux besoins du patient (allant de 35 à 150 battements par minutes) et le volume systolique (30 à 65mL). Le débit sanguin pulsatile est réglé en revanche pour ne jamais dépasser 9L/min pour protéger les poumons des pressions trop élevées dans l'oreillette gauche⁴⁶. L'algorithme de régulation automatique du débit sanguin peut être initié dès la fin de l'opération, en stoppant la circulation extracorporelle, cela nécessite un redémarrage de la prothèse, stoppant le flux sanguin moins d'une seconde, ensuite le mode de régulation automatique prend le relais qui finit par récupérer les paramètres par défaut au bout de 60 secondes de fonctionnement. Cette étape ne comporte aucun danger pour le patient grâce aux premières observations faites sur les expérimentations animales sur les veaux, de plus les données hémodynamiques sont directement visibles avec la surveillance clinique. L'activation du mode automatique est directement avantageuse pour le patient car directement adaptée aux conditions post-opératoires du patient. L'avantage de la régulation automatique est l'adaptation du débit

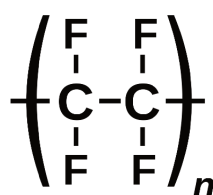
cardiaque. Ce débit est préréglé en fonction des besoins physiologique du patient, en assurant un équilibre gauche/droit optimal pour limiter les risques d'œdème pulmonaire.

Les matériaux synthétiques

J'ai donné les éléments composants le TAH Aeson auparavant, le dacron, l'ePTFE et le polyuréthane. Ces éléments sont connus pour leur biocompatibilité, c'est-à-dire leur capacité à maintenir leur état ou d'assurer leur fonction au cours du temps sans interférer ou dégrader le milieu biologique dans lequel ils sont utilisés, ici l'organisme de l'hôte. Dans le cadre de ma thèse nous voulions voir si l'immunité de l'hôte interagissait avec la bioprothèse Aeson, car les interactions de ces biomatériaux avec les molécules de l'hémostase est relativement bien documenté, il n'en est pas de même pour leurs interactions avec l'immunité. Je vais vous présenter ce qui est connu dans les matériaux utilisés par le TAH Aeson.

L'ePTFE

Ce matériaux, expanded polytetrafluoroéthylène ou polytétrafluoroéthylène expansé est un fluoropolymère synthétique. Il a été découvert accidentellement en 1938 par Roy J. Plunkett. Ce nouveau plastique fluoré sera breveté plusieurs années plus tard en 1941⁵⁹ et enregistré sous le nom de téflon en 1945. Voici sa structure chimique.



Les propriétés remarquables de l'ePTFE sont un coefficient de friction très faible, une résistance chimique et thermiques excellentes et sa capacité à être chimiquement inerte, font de ce thermoplastique un matériaux excellent pour un grand nombre d'applications. Il sert notamment d'isolant électrique dans l'industrie électronique, de matériaux couvrant des tuyaux ou de contenant pour la manipulation d'acides dans l'industrie chimique et son utilisation la plus connue pour le public est le revêtement d'ustensile de cuisine.

Le PTFE est expansé à la suite de traitements de chauffage, d'étirements et d'extrusion. Son utilisation dans le domaine médical débute en 1960 pour l'utiliser comme matériau dans les conduites vasculaires synthétiques sous le nom de Gore-tex⁶⁰. Le PTFE est un matériau qui est également électronégatif ce qui réduit son interaction avec les protéines et molécules sanguines, donnant une propriété bio-stable au matériau⁶¹. En effet, les greffes faites en ePTFE ne subissent quasiment de dégradation biologique après implantation. Le PTFE expansé se caractérise par sa structure en nœuds-fibrille, où chaque nœud sont interconnectés par de fines fibrilles, avec une distance internodal moyenne de 30µm pour un greffon standard⁶¹. En cours d'implantation au contact avec le flux sanguin, il a été observé sur l'ePTFE un dépôt amorphe fibrino-plaquettaire sur une durée de 6-18 mois. Il n'y a en revanche pas de dépôts cellulaires sur l'ePTFE même après plusieurs années d'implantations. Ce biomatériau est souvent mis en concurrence avec le dacron et contrairement à ce dernier, l'ePTFE n'a pas de migration ni d'hyperplasie des cellules endothéliales pouvant venir des berges anastomosées, l'endothélialisation reste donc cantonnée, je reviendrai sur ce point plus tard pour le dacron. Pour tenter d'améliorer ce trait trouvé dans le dacron, la distance internodale joue un rôle majeur dans l'interaction du greffon et les cellules de l'hôte, ce qui a été constaté dans une étude sur des greffes de conduites vasculaires en ePTFE dans l'artère aortique des babouins, où une distance internodale optimale a été calculé (à 60µm au lieu de 30µm) et les résultats sur l'endothélialisation des greffes. D'autres modèles animaux ont montré des résultats similaires^{62,63}, mais ces résultats ne sont pas retrouvés chez l'humain. Cette différence serait due aux animaux utilisés pour ces études, leur âge et leur taille, où les petits animaux auront une forte hyperplasie, avec un recouvrement complet de leur greffe avec une forte migration cellulaire de la part des cellules sur les bords anastomosés, ce qui n'est pas le cas pour les patients humains⁶⁴. Cependant de nouvelles études proposant des traitements angiogéniques chez le patients, ou encore des revêtements de la surface de l'ePTFE avec de la fibrine et de l'héparine et des hormones de croissance FGF et VEGF montrent des résultats prometteurs^{64,65}.

Dacron

Dacron est le nom d'usage courant utilisé pour désigner le polyéthylène terephthalate (PET, terme anglais), ou polytéréphtalate d'éthylène (terme français) inventé par Wallace Carothers aux laboratoires DuPont en 1939. Sa structure chimique se compose comme suit : il s'agit d'un polymère de type polyester saturé, obtenu par polycondensation de l'acide téréphtalique avec l'éthylène glycol, le plus commun dans la famille des résines de polymères thermoplastiques. Le Dacron est un matériau très résistant et durable, imperméable, résistant aux UV et à la chaleur. Ces propriétés en font un choix idéal pour le thermoformage lui donnant une grande variété d'applications, notamment :

- Textiles : le Dacron est utilisé pour fabriquer des vêtements, des draps, des rideaux et d'autres articles textiles sous sa forme en fibres synthétiques (plus communément nommé « polyester »).
- Emballages : le Dacron est utilisé pour fabriquer des sacs, des boîtes et d'autres emballages.
- Industrie manufacturière : le Dacron est utilisé pour fabriquer des pièces automobiles, des pièces d'avion et d'autres produits manufacturés.
- Chirurgie : le Dacron est utilisé pour fabriquer des greffes vasculaires, des prothèses cardiaques et d'autres implants chirurgicaux.

Le Dacron est un matériau sûr et non toxique, recyclable et biodégradable et peut également être utilisé associé à d'autres composants pour produire différents types de résines. L'utilisation du matériau vu son brevet déposé pour la première fois en 1941⁶⁶, et à partir de 1957 par Julian et 1958 par DeBakey⁶⁷, eurent lieu les premières implantations utilisant du Dacron dans le cadre de greffes vasculaires. Utilisé dans la confection de conduites vasculaires synthétiques, le Dacron peut exister sous 2 formes : la forme tissée ou

la forme tricotée⁶¹. Sous sa forme tissée, il présente une porosité faible et une perméabilité limitée du fait du motif superposé des filaments au sein du tissu. Toutefois, ce motif entraîne, lui, une compliance moindre, qui correspond à la capacité de déformation en fonction de la pression imposée sur le matériau. Ceci peut s'avérer fatal puisqu'elle peut altérer les caractéristiques de transmissions des ondes de pressions pulsatiles imposées par le fluide lors des contractions cardiaques⁶⁸.

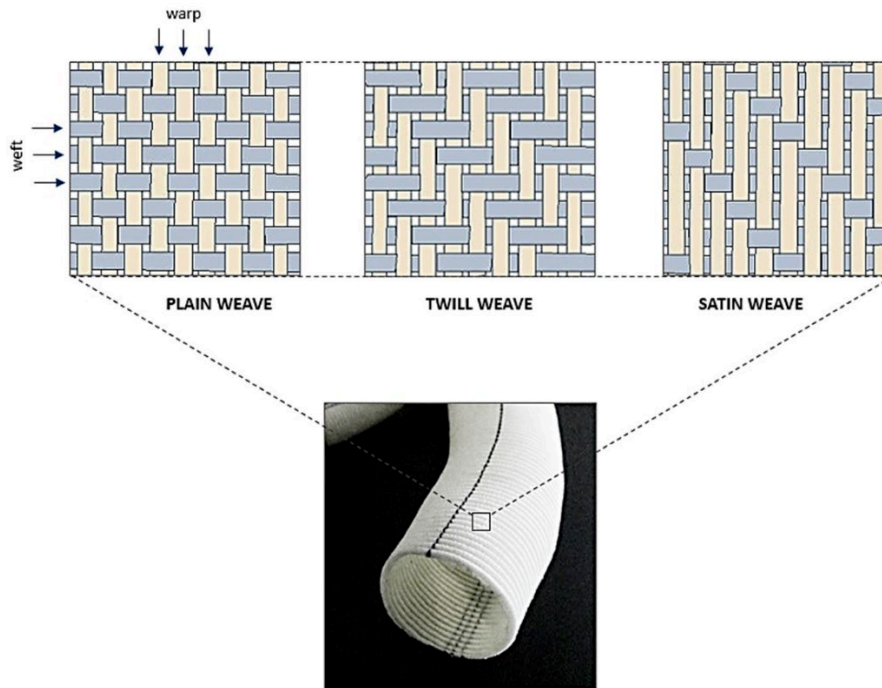


Figure 10 : Patterns de tissage des tissus synthétiques en Dacron dans les conduites vasculaires⁵⁷

Une autre forme, la forme tricotée, est quant à elle conçue d'après un procédé textile en forme de boucles, lui conférant une porosité plus importante mais également une plus grande compliance radiale et de meilleures capacités de déformation que le Dacron tissé. Introduites pour la première fois en pratique clinique en 1955, les greffes de conduits en Dacron tricoté ont été proposées dans le but de supprimer le problème de couture posé par les greffes en Dacron tissé, ces dernières ne permettant pas la confection d'une conduite sans couture⁶⁹. Devenu par la suite un matériau de greffe standard, le Dacron s'est démarqué en raison de sa meilleure bio stabilité à long terme comparé aux autres matériaux

disponibles à l'époque (à savoir le Nylon et Orlon). Ayant cependant une porosité élevée, ce type de fabrication nécessite néanmoins un traitement afin de prévenir l'extravasation du sang à travers la paroi du conduit. Pour pallier le problème de perméabilité au fluide sanguin, plusieurs méthodes de recouvrement de la surface du matériau sont proposées, telles que le recouvrement ou l'imprégnation par de la gélatine, du collagène ou bien encore d'albumine ce qui permet de réduire la taille des pores de la paroi. Afin de diminuer encore la porosité sans empêcher la dégradation progressive des recouvrements ou des imprégnations post-implantation⁶¹, il peut également être réticulé par de faibles concentrations de formaldéhyde. La bonne bio-stabilité du Dacron post-implantation lui permet de persister pendant plus de 10 ans dans l'organisme sans détérioration significative. Il n'y a pas de différence notable dans les résultats cliniques en termes de complications et de perméabilité murale entre les conduites en Dacron tissé et tricoté en utilisation de greffe pour pontage aorto-iliaque⁷⁰. Dès l'implantation et le recouvrement du flux sanguin, une première étape d'adsorption protéique à la surface du matériau prend place, suivi par une phase d'adhésion plaquettaire, puis la migration et l'infiltration de cellules inflammatoires (mécanisme déjà traité dans la partie concernant le PTFE). Ce dépôt fibrino-plaquettaire se fait durant les premières heures voire jours, et se stabilise sur une période de 6 à 18 mois formant une couche compacte comme pour l'ePTFE. Une migration de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses est observée au niveau des anastomoses⁷¹, mais aussi de cellules endothéliales⁷².

Polyuréthane

Les greffes en ePTFE et en dacron ont démontré être relativement peu compliantes. Cette différence de compliance entre le vaisseau natif et le matériau dans les greffes vasculaires semblerait pouvoir potentiellement contribuer au développement d'une hyperplasie dans les régions anastomotiques, bien que ce fait soit aujourd'hui controversé. Des polymères élastiques ont été introduits pour permettre de mettre au point des greffes vasculaires plus élastiques. Les polyuréthanes (PU) sont une grande famille de polymères élastiques contenant un groupe uréthane [-NH-(CO)-O-]. Initialement développés en Allemagne dans les années 1930, les polyuréthanes ont été commercialisés par DuPont en 1962 et sont

utilisés dans des applications biomédicales depuis les années 1960. Ceux-ci sont composés généralement de copolymères constitués de trois monomères différents : les segments cristallins (durs) et amorphes (mous), le premier amenant la rigidité et le second la flexibilité, qui peuvent être variable selon le fabricant, ainsi qu'un troisième monomère servant d'agent d'allongement de chaîne permettant d'obtenir une structure semblable à celle-ci :

Des matériaux possédant différentes caractéristiques mécaniques peuvent être produits par une combinaison des 3 monomères, faisant du PU un polymère intéressant comme biomatériau.

Pour son usage en tant que biomatériau, le PU a d'abord été utilisé dans la fabrication de pompes implantables et de dispositifs d'assistances ventriculaires gauches, ainsi que comme revêtement pour les premiers cœurs artificiels⁷³.

Ce matériau attrayant pour les greffes vasculaires possède des propriétés mécaniques élastiques et de compliance supérieure ainsi qu'une biocompatibilité acceptable, ce qui explique le vif intérêt de la part de l'industrie pour le développement de greffes vasculaires de petit diamètre à base de PU.

Des PU en polyester furent utilisés pour la première génération de greffes vasculaires mais malgré une bonne biocompatibilité, les greffons subirent des modifications chimiques de surface et une détérioration in vivo fut mise en évidence⁶¹.

Les PU contenant des polyester-polyols étant également instables car sujets à une dégradation par hydrolyse, des PU à base de polyéthers furent ensuite utilisés. Mais il s'avéra que polyétheruréthane est relativement insensible à l'hydrolyse, entraînant sa dégradation⁷⁴.

Toutefois, il a été noté que la greffe en PU s'allongeait avec le temps après l'implantation et que l'incidence de la formation de pseudointima au niveau des anastomoses était plus élevée que dans les greffes en ePTFE. Une nouvelle génération de greffes vasculaires utilise des PU à base de polycarbonate qui éliminent la plupart des

liaisons éther et sont donc stables vis-à-vis des réactions d'hydrolyse et d'oxydation et donc plus résistants à la biodégradation⁷⁵.

Les greffes en poly(carbonate-urée) uréthane (Chronoflex, CardioTech International, Woburn, Mass) ont une meilleure stabilité, car le polymère ne comporte pas de liaisons éther ni ester.

C'est cette formule de polymère qui est utilisée actuellement dans la membrane hybride du cœur artificiel Carmat.

Les réactions tissulaires aux greffes en PU sont discordantes dans la littérature car des facteurs tels que les différents monomères utilisés pour la fabrication du polymère, la technique de fabrication de la conduite, la porosité et les modifications de surface affectent potentiellement tous les résultats.

Le péricarde, matériau xénogénique

Le péricarde xénogénique a été mis au point par le professeur Alain Carpentier en 1960 pour être l'élément principal de la confection de valve bioprothétique. Le péricarde xénogénique peut être d'origine bovine ou porcine, mais le plus couramment utilisé est le péricarde bovin. Le péricarde bovin est plus facile à manipuler et induit moins de saignement de suture. Le péricarde bovin est constitué de 3 couches :

- Une couche séreuse mince, interne constituée de cellules mésothéliales,
- une couche fibreuse, plus épaisse et formée de faisceaux ondulés de collagène et d'élastine
- une couche externe de tissus conjonctif épipéricardique en partie continue avec des ligaments pécarnosternaux⁷⁶. Le péricarde est fixé à la glutaraldéhyde ($C_5H_8O_2$) qui a plusieurs effets sur le péricarde, elle induit la réticulation des fibres de collagène ce qui augmente la stabilité in vivo de la matrice et une réduction de la réponse immunitaire antigénique en « masquant » les déterminants antigéniques de l'hôte⁵⁷. Les groupements aldéhydes terminaux avec la chaîne de cinq carbones vont se lier de manière covalente et des interactions avec les groupements NH_2 des acides aminés lysines, de l'hydroxylysine

et/ou des extrémité N-terminale des acides aminés. Cela permet la formation de liaisons amine, interagissant également avec le collagène pour former des liaisons tropocollagènes. Les liaisons amines créées par l'action du glutaraldéhyde formeront de même des liaisons covalentes avec les protéines adjacentes qui seront stables à pH et température corporelle, donnant une résistance mécanique et à la biodégradation. De plus le traitement au glutaraldéhyde apporte une stérilisation du péricarde, car bactéricide, fongicide et virucide. L'utilisation de ce biomatériau a montré des avantages pour sa capacité à s'endothélialiser^{58,77,78}. En effet, le péricarde est un tissu composé d'une matrice de collagène qui est idéale pour la migration des cellules de l'hôte. Or il a été observé une migration de cellules souches Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} depuis le sang périphérique après 1 mois d'implantation avec le TAH Aeson.

1.4. Hémocompatibilité des LVAD et des TAH

L'hémocompatibilité est par définition la propriété de ce qui peut être mis au contact avec le sang sans induire de thrombose ni absorber l'un de ses constituants. Nous avons vu en parti les problèmes rencontrés par les LVAD notamment des problèmes d'hémocompatibilités^{28,79,80}, à savoir hémorragies, hémorragies gastro-intestinaux et thromboses. Comme discuté précédemment pour le cœur artificiel bioprothétique total Aeson de Carmat, l'hémocompatibilité est un élément majeur du dispositif, où les matériaux ont été sélectionnés pour maximiser cette propriété, allant jusqu'à l'améliorer durant l'implantation grâce à une acquisition d'hémocompatibilité^{44,58}.

Une triade des interactions entre la surface artificielle en contact avec le sang, les forces de cisaillements et les altérations du sang (figure15) a été conceptualisée⁸¹. Les éléments du flux sanguins qui seront particulièrement affectés par le VAD sont des facteurs de la coagulation (comme le VWF), les plaquettes et les érythrocytes.

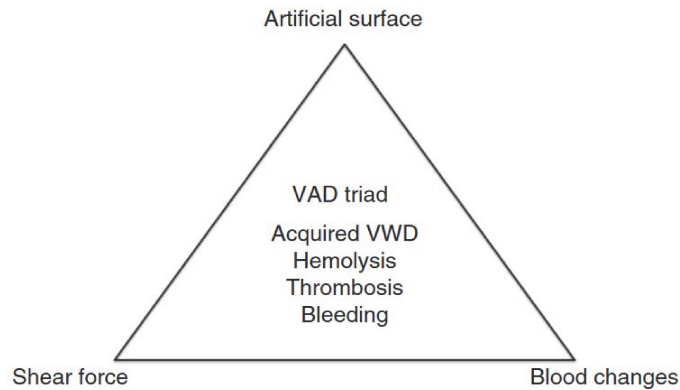


Figure 15 : Triade des assistances ventriculaires (VAD)⁸¹

Thrombose de la pompe

La thrombose de la pompe est un évènement indésirable apparaissant potentiellement chez les patients implantés avec une VAD. Elle ne peut se détecter qu'à travers divers manifestations cliniques et biochimiques. INTERMACS a standardisé ces critères permettant de définir une thrombose de la pompe, qui sont les suivantes

- Taux de Lactate DésHydrogénase (LDH) > 2.0 fois la valeur normale supérieure
- Taux d'hémoglobine plasmatique > 40 mg/dL
- Hémoglobinurie
- Altérations des paramètres de la pompe (modification de la puissance avec génération de pseudo-flux ou perte de flux et de puissance)
- Son anormal du dispositif détecté durant l'auscultation
- Observation d'un dépôt organisé de fibrine dans la conduit d'injection du sang dans la pompe après retrait du dispositif⁸²

Depuis l'étude pivot initiale et cela s'est confirmé dans d'autres études post approbation commerciale du VAD⁸³⁻⁸⁵, des thromboses de pompe ont été rapporté. Son incidence dans ces études pour des patients implantés avec HMII est évaluée entre 2 et 4%, avec 0.03 évènement par patient par an (EPPY)(qui serait à multiplier par 100 pour obtenir le nombre de patient parmi la centaine subissant un évènement indésirable en moyenne par an, ce qui équivaldrait à 3% par an) à un an de suivi pendant l'essai clinique BTT⁸⁵. A 2 ans

de suivi durant l'essai clinique en DT, il la thrombose de pompe est à 0.024 EPPY⁸⁴ et elle passe à 0.038 EPPY chez les 281 patients ajoutés en cours de l'étude⁸⁶ Cependant, des données obtenues en conditions réelles montrent une augmentation significative des cas de thrombose de la pompe avec HMII après 2011, avec une occurrence à 8.4% à 3 mois de support⁸⁷ et une occurrence à 6% à 6 mois de support⁸⁸. Une fois que plus de données ont pu être générées, il a été rapporté que l'occurrence de thrombose de la pompe serait estimé à 18.6% et 17.9%, respectivement pendant les 2 premières années et durant les 5 années suivantes de support avec le dispositif⁸⁹. La troisième génération de VAD, notamment le HM3, a permis de grandement réduire l'occurrence de thrombose de pompe, comme montré dans l'essai clinique Momentum 3⁹⁰, elle est actuellement estimé entre 1.2% et 2.8% respectivement pendant la troisième et la cinquième année de suivi post-implantation⁸⁹. Cette tendance a été confirmée sur un suivi après 5 ans d'implantation (avec une occurrence de 0.010 évènements par patients par an pour HM3 contre 0.12 EPPY pour HMII). Les patients enrôlés pour Momentum 3 ont reçu un traitement antithrombotique à base d'aspirine, à une dose quotidienne allant de 81 à 325mg, et de warfarine, en ciblant une valeur d'international-normalized ratio (INR, déterminant le temps de coagulation du sang) comprise entre 2 et 3. Dans l'éventualité du diagnostic d'une thrombose de la pompe, le seul traitement possible est de changer la pompe pour une autre¹. Les connaissances actuelles sur l'efficacité de la gestion médicale des thromboses de LVAD est néanmoins limité car la plupart des études ne sont pas randomisées⁹¹. Dans une étude plus récente, sur 341 patients étudiés implantés avec le LVAD HM3, 37 ont développé une thrombose de la pompe, 5 patients ont eu un remplacement de la pompe, 6 ont seulement reçu de l'héparine en intraveineuse et 26 patients ont reçu un traitement thrombolytique. Sur ces 26 patients, pour 11.5% des patients, ce traitement a été efficace (n=3) et 69.2% ont dû remplacer leur dispositif malgré une nette amélioration du taux de LDH et de l'hémoglobine plasmatique⁹². Les premières séries d'études avec les implantations d'HMII montraient déjà l'efficacité limitée des traitements thrombolytiques. Sur les 40 thromboses des 40 patients qui n'ont pas eu un remplacement de leur dispositif, leur mortalité actuarielle était de 48.5% (95% CI, 31.6 – 65.2) dans les 6 mois suivant le diagnostic⁸⁷. Peu de rapports d'analyses histologiques ont été effectués sur les dépôts de caillots récupérés dans les LVAD après leur explantation. Les clots sont couches hétérogènes de fibrines, de VWF, de leucocytes et de

plaquettes⁹³. Ces observations pourraient expliquer l'inefficacité des traitements avec un activateur tissulaire du plasminogène (tPA) dans un contexte clinique. Si le traitement est néanmoins efficace (normalisation des pics de tensions avec normalisation de la LDH et de l'hémoglobine plasmatique) le patient devrait être traité avec de plus fortes doses d'anticoagulants (Aspirine 325mg/jour, et cibler une INR à 2.5-3.0 avec si possible, un deuxième agent antiplaquettaire comme clopidogrel. Mais la thrombose n'est pas dû simplement au potentiel défaut du dispositif, car il existe en effet des facteurs liés aux patients pouvant augmenter les risques de son apparition, notamment : la jeunesse du patient, le groupe ethnique (caucasien), un IMC élevé, LVEF < 20% et une hémolyse quantifiée par un taux LDH supérieur à 500UI/dL pendant plus d'un mois^{87,88}

Les hypothèses pathophysiologiques de la thrombose

Thrombose/hémolyse

L'hémolyse est une complication grave impliquant la destruction des hématies contribuant à l'augmentation du taux d'hémoglobine plasmatique. L'hémoglobine peut réagir avec des oxydes nitriques (NO) sécrétées par les cellules endothéliales, provoquant ainsi une diminution des NO qui peuvent par ailleurs agir en tant qu'inhibiteur de l'activation plaquettaire et comme vasodilatateur. Il y a également eu des observations d'interactions entre l'hémoglobine et le VWF en se liant au domaine A2, augmentant l'affinité du domaine de liaison A1 de VWF au domaine GPIIb/IIIa des plaquettes^{94,95} augmentant alors l'adhésion des VWF aux plaquettes et ainsi leur agrégation. L'hémolyse est observée dans environ 2% des patients implantés avec un LVAD⁹⁶ et est généralement considéré comme une conséquence des érythrocytes subissant des tensions physiques trop fortes, provoquant ainsi leur destruction⁹⁷⁻⁹⁹. Cet événement indésirable apparait dans moins de 1.4% des patients implantés avec le TAH Aeson et cela ne semble pas lier au dispositif en lui-même^{48,100}. Dans le cadre d'une implantation avec une MCS, l'hémolyse est la conséquence de l'hémodynamique induite par le dispositif. Dans le cas d'une implantation avec une VAD comme HeartMate II et HeartWare avec des dommages aux érythrocytes ont été

observés¹⁰¹. Ces dommages peuvent être mesurés avec l'analyse du taux de Lactate DéHydrogénase (LDH) ou encore par l'analyse du taux d'hémoglobine plasmatique. Il est possible d'estimer numériquement les dommages des MCS via une équation, l'indice hémolytique $IH = A \times \tau^x \times t^y$: A est une constante, τ est la force de cisaillement et t est le temps d'exposition (du sang). Il est admis que le seuil de dégradation des hématies se fait à 150Pa¹⁰².

Thrombose/dysfonction endothéliale

La dysfonction endothéliale est un des éléments clef de la thrombose à travers plusieurs voies. La dysfonction endothéliale peut mener à la perte de la barrière antithrombotique endothéliale et ainsi contribuer à la thrombose. En temps normal, le signal mécanique des forces de cisaillement du flux sanguin unidirectionnel laminaire est important car ce flux permet l'alignement des cellules endothéliales et leur regroupement, empêchant ainsi le sang d'être en contact avec la matrice extracellulaire. De plus, ces cellules endothéliales peuvent sécréter des agents antiplaquettaires comme les NO (CF partie 1.3.1.) et la prostacycline. Dans le cas d'implantation d'un LVAD, cela modifie les forces de cisaillements sur la paroi endothéliale avec le flux continu généré, ce qui peut amener à une altération de la mécanotransduction des cellules endothéliales et ainsi induire un endothélium désorganisé. Ce phénomène limite la fonction endothéliale, ce qui amène à un déséquilibre dans le tonus vasculaire, l'inflammation, le stress oxydatif et la thrombose.

D'autres facteurs contribuent à la perte de la fonction endothéliale dans un contexte d'implantation avec un LVAD, à savoir :

- L'inflammation systémique/chronique
- La thrombose, liée à la présence de matériau étranger et aux forces de cisaillement altérées. Ces derniers contribuent à augmenter les risques d'apparition de thrombose mais aussi d'hémolyse, qui peuvent endommager les cellules endothéliales

- Le stress oxydant (oxydatif). Pendant le support avec un LVAD, il est possible que le patient développe un stress oxydant qui va également contribuer à la perte de fonction endothéliale et donc au dysfonctionnement de l'endothélium
- Lésions mécaniques. La procédure chirurgicale, au moment de l'implantation, en elle-même avec ensuite le flux généré par le LVAD et le contact du sang avec les matériaux synthétiques peuvent provoquer des lésions mécaniques aux cellules endothéliales et ainsi exacerber leur dysfonctionnement

Dans le cas d'implantation avec LVAD, la dysfonction endothéliale a été décrite pendant leur support avec le dispositif. cependant, des différences sont observées dans les groupes contrôles, ce qui amène à des résultats et interprétations contradictoires¹⁰³⁻¹⁰⁷. Ces divergences existent également pour les biomarqueurs. En effet, le taux de vésicules extracellulaires des cellules endothéliales (utilisé comme biomarqueurs de la dysfonction endothéliale) a été analysé durant le support avec le LVAD par les différentes études^{106,108,109}. Néanmoins, les différentes techniques utilisées et les différents groupes contrôles ne donnent pas de réponse claire sur l'état de la dysfonction endothéliale quand il s'agit d'étude sur les biomarqueurs.

De plus, il a été montré qu'un flux pulsatile trop bas induisait une augmentation de micro ARN (miARN) circulants, contribuant à la dysfonction endothéliale et à au remodelage vasculaire dans un contexte d'implantation avec un LVAD¹¹⁰. Les miARN circulant sont des ARN de petites tailles non-codant , régulant l'expression de gènes et de par leur fonctionnement, il a été proposé à ce qu'ils soient considéré comme agissant comme des hormones car ils sont sécrétés et absorbés entre des cellules donneuses et receveuses¹¹¹. Les cellules endothéliales constituant la surface interne du système vasculaire, ont été proposées à de multiples reprises comme étant des cellules receveuses des miARN circulantes et ces derniers ont été également proposés comme modulateurs des cellules endothéliales car ils agissent sur le dysfonctionnement endothélial par plusieurs mécanismes :

- Les miARNs circulants tels que miR-155 ont été observés comme régulateurs de la synthèse d'oxyde nitrique en ciblant directement l'ARNm de endothelial Nitric Oxid Synthase (eNOS) dans les HUVECs et bloquent la relaxation vasculaire endothélium-dépendante dans les artères humaines¹¹².
- Les miARNs circulants peuvent moduler l'expression de molécules d'adhésion comme intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) dans les cellules endothéliales. Des miARNs tels que miR-126 participent à la régulation de ces molécules d'adhésion, dans l'étude, ce miARN circulant avait impacté la capacité des leucocytes à adhérer à l'endothélium, contribuant ainsi à l'inflammation associée à la dysfonction endothéliale^{113,114}.
- Stress oxydant et la sénescence endothéliale : les miARNs circulants comme miR-126 peuvent moduler les voies d'activation du stress oxydant et d'apoptose des cellules endothéliales^{115,116}.
- Angiogenèse et prolifération des cellules endothéliales : les miARN circulants jouent un rôle dans l'angiogenèse, le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. En effet, miR-126, miR-146 et miR-663 jouent un rôle essentiel dans la régulation de VEGF-A, la prolifération endothéliale ou dans l'angiogenèse^{117,118}. La perte de ces miARN circulants peut perturber le fragile équilibre de l'angiogenèse et du remodelage vasculaire, contribuant ainsi à la dysfonction endothéliale. Les facteurs hémodynamiques, connus pour leur influence dans la fonction endothéliale sur plusieurs voies de signalisation¹¹⁹, doivent aujourd'hui être pris en compte dans la dysfonction endothéliale, car les MCS altérant le flux physiologique et les forces de cisaillement sur la paroi endothéliale peuvent envoyer un signal mécanotransducteur pouvant dérégler les cellules endothéliales.

Les patients implantés avec le TAH Aeson en mode manuel ont également développé une dysfonction endothéliale. Cela peut être une conséquence de la perméabilité vasculaire associée avec une absence d'un retour veineux, mais ce problème n'est plus observable chez

les patients implantés avec le TAH-Aeson en mode autorégulé¹²⁰. Le « mode manuel » du dispositif était la première version de la prothèse, celui qui a été utilisé pour l'étude de faisabilité avec un débit cardiaque prédéfini par le médecin sans prendre en compte le retour veineux. Le « mode autorégulé » du TAH Aeson fait référence à la prothèse utilisée pendant l'étude Pivot et dans les études post marquage CE. Dans ce mode, le retour veineux est pris en compte (car est un critère de modulation du débit cardiaque) comme dans un cœur naturel. Ces études montrent que le fait de maintenir une pulsatilité physiologique est important pour l'homéostasie endothéliale. En effet, la pulsatilité joue un rôle essentiel dans la préservation de la fonction endothéliale et du maintien de l'intégralité vasculaire pour plusieurs raisons :

- Sur la génération des forces de cisaillement
- La synthèse et la sécrétion de NO
- Les agents vasoactifs, jouant un rôle dans le tonus vasculaire et dans le maintien de son intégrité
- Un effet anti-inflammatoire en réduisant l'activation des cellules endothéliales et de l'expression de molécules pro-inflammatoire.
- En empêchant la stagnation du sang¹²¹

. Dans le contexte d'une implantation avec un MCS, il a déjà été établi que la pulsatilité était l'élément déclencheur de la sécrétion de nouveaux VWF, permettant de contrebalancer la dégradation des VWF par les fortes forces de cisaillement¹²². Donc, en inversant le phénotype endothélial avec la sécrétion de VWF, la pulsatilité peut corriger les conséquences d'une implantation avec un dispositif avec un flux continu.

De plus, les LVADs ont une grande surface non endothélialisée (matériaux synthétiques en contact avec le sang). Des protéines plasmatiques sont vite absorbées par les matériaux du LVAD en contact avec le sang, incluant le fibrinogène, le VWF, l'albumine et des protéines de la voie de coagulation intrinsèque en majorité. Le fibrinogène immobilisée et les VWF vont ancrer les plaquettes sur ces surfaces¹²³. La liaison de pro-enzymes (facteur XII, prékallikréine et facteur XI) et du cofacteur kininogène, charge négativement les surfaces artificielles, ce qui va initier la voie de coagulation intrinsèque. Cela va déclencher une

coagulation localisée avec la génération de FXIIa, clivant la prékallikréine en kallikréine active au niveau des surfaces du LVAD en contact avec le sang^{124,125}. Cela peut provoquer une réaction en chaîne, activant plus de FXII, les FXIIa vont ensuite activer les FXI et ainsi activer encore plus la voie intrinsèque de la coagulation, générant ainsi de la thrombine et donc de la fibrine.

La voie extrinsèque de la coagulation peut aussi intervenir avec les facteurs tissulaires qui sont également exposés aux plaquettes venant adhérer à la surface et d'autres cellules, comme par exemple, les cellules endothéliales dysfonctionnelles. Par ailleurs, l'absorption de protéines et l'adhésion des plaquettes peuvent être aussi bien prothrombotique dans un premier temps, avec l'agrégation des plaquettes et la coagulation, puis antithrombotique. Cette dernière s'explique par la diminution de plaquette et de protéines dans la circulation, réduisant ainsi la concentration sanguine et ainsi créer un déséquilibre de l'hémostase.

Dans la cas d'implantation avec le TAH Aeson, aucun évènement liée à la thrombose n'a été signalé, aussi bien dans les essais pré-clinique¹²⁶ que dans les essais cliniques^{48,49,100}. Dans les modèles animaux, malgré l'absence d'anticoagulant, les dispositifs récupérés n'ont montré aucun signe de thrombose, les reins et le cerveau n'ont montré aucun signe d'ischémie¹²⁷.

Les ventricules du TAH ont ainsi pu montrer des propriétés antithrombotiques car aucune thrombose n'a été observée dans les cavités à l'explantation, ce qui peut être le résultat de l'apparition de cellules endothéliales sur la face péricarde de la membrane hybride¹²⁸. Cette endothélialisation peut être le résultats d'une colonisation de cellules souches ou progénitrices circulantes sur le péricarde xénogénique^{129,130}, ce qui serait cohérent avec les résultats de Guyonnet et al. qui a démontré l'augmentation de cellules souches circulantes Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} au cours du support avec le TAH Aeson¹³⁰.

Thrombose/Inflammation

L'inflammation est l'ensemble des évènements à l'activation du système immunitaire par l'hôte en réponse à une infection ou des tissus endommagés. Les patients en IC développent un état d'inflammation chronique au cours de la progression de la maladie et

pourraient être la cause des multiples comorbidités observés chez ces patients¹³¹ dont la thrombose. En effet, les patients en IC ont des taux plus élevés de cytokines pro-inflammatoires tels que IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , NF-kb etc, mais leur rôle dans cette maladie n'a été révélé que récemment en traitant des patients en IC avec un inhibiteur d'IL-1 β , la canakinumab, un anticorps monoclonal dirigé contre IL-1 β ¹³², améliorant ainsi leur pronostic vital. D'autres cytokines liés à la formation de fibrocytes (lié à la fibrose des tissus cardiaques) soluble suppression tumorigenesis (sST-2) et galectin-3 sont devenus des biomarqueurs permettant de prédire le pronostic des patients IC^{133,134}. De plus, les patients en IC ont des troubles neuro-hormonaux avec un déséquilibre du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) et une surstimulation du système nerveux sympathique (SNS). Le LVAD du fait de son flux continu ne stimule plus les barorécepteurs du système circulatoire, entraînant une suractivation du SNS, ce qui conduira à la hausse du taux d'angiotensine I et II, ce qui contribuera à maintenir la suractivation du SNS, entrant alors dans un cercle vicieux. Dans le cas des RAAS, les patients implantés avec un LVAD à flux continu vont voir leur taux de RAAS diminuer après l'opération, car le flux sanguin se normalise avec le dispositif, ce qui conduit à une diminution du taux de rénine et de l'aldostérone, ce qui a pour conséquence une réduction de la déplétion de l'angiotensine, ce qui induit donc une augmentation du taux d'angiotensine, cela va ainsi contribuer à la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires TNF-alpha, l'IL-6, l'IL-8 et la CRP¹³⁵. De plus le flux continu induit la proliférations de cellules musculaire lisses vasculaires (vSMC) ce qui réduira l'étirement mécaniques des mécanorécepteurs vasculaires et ainsi provoquera à nouveau l'activation de RAAS¹³⁶. L'hyperactivation des RAAS en cas d'inflammation chronique a également été démontré sur modèle animal¹³⁷. Cette activation du système RAAS dans les LVAD à flux continue est plus forte que chez les patients implantés avec la première génération de LVAD à flux pulsatile¹³⁸. Comme vu dans les points précédents, les patients implantés avec un MCS de type VAD (LVAD, RVAD, BiVAD) développent des problèmes d'hémolyses, des troubles de l'hémostase, de l'inflammation et des infections. En ce qui concerne l'inflammation, cet évènement peut apparaitre en post-opératoire, après l'implantation du LVAD. De plus, l'augmentation de l'inflammation semble corrélée à une mortalité plus élevée¹³⁹⁻¹⁴² en plus de développer une dysfonction immunitaire^{143,144}. Des niveaux accrus de cytokines inflammatoires semblent également associés au développement

d'une défaillance multi-organes postopératoire^{23,145,146} ou à la thrombose¹⁴⁷. Dès les premières générations de LVAD à flux pulsatile, les patients bénéficiant de cette thérapies avaient des taux de cytokines pro-inflammatoire plus élevés comparé aux patients sains et des patients IC en thérapie médicamenteuse¹⁴⁸. Mais il n'a jamais été montré si le fait de ce taux élevé de cytokines pro-inflammatoires était dû à l'implantation de LVAD à flux pulsatile (le contact du sang avec des matériaux synthétiques) ou à l'état avancé des patients dans leur IC. En revanche une étude avait montré en 1997 que des patients après leur implantation avec le LVAD pulsatile avaient une diminution du taux d'IL-6 et d'IL-8 en comparaison avec leur taux préopératoire, ce qui suggère que l'altération hémodynamique est jouerait un rôle prédominant sur l'inflammation en comparaison du contact du sang avec le VAD¹⁴⁹. Dans la continuité, les VAD à flux continu (CF-LVAD) remplaçant les VAD (PF-LVAD) pulsatile, on observait à l'époque une amélioration de la qualité de vie des patients^{17,18}. Des études sur les cytokines inflammatoires comparant des patients implantés avec les deux types de LVAD (flux pulsatile et flux continu) ont montré des résultats intéressants, et ce bien que les deux types de dispositifs montraient des taux élevés de ces cytokines. Les taux de TNF- α sont similaires après 3 mois d'implantation, mais les patients implantés avec le CF-LVAD ont des taux d'IL-6 plus élevés que chez les patients PF-LVAD¹⁵⁰. La même constatation avait été faite pour le taux des protéine C-réactive circulantes corrélée avec le taux élevé de leukocytes¹⁵¹. Dans d'autres études comparant les patients CF-LVAD avec les patients IC et les volontaires sains, les taux de CRP, d'Interferon α induced protein 10(IP-10), de Monocyt Chemotactic Protein-1 (MCP-1) et d'IL-8 sont plus élevés chez les patients IC et CF-LVAD. Pour certaines cytokines comme granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF); de macrophage inflammatory proteins-1 β (MIP-1 β) et de macrophage-derived chemokine (MDC), ces taux sont plus élevés chez les patients implantés avec un CF-LVAD comparé aux patients IC et aux volontaires sains¹⁵². Une autre étude avait aussi observée l'augmentation du taux de TNF- α chez les patients LVAD. De par les précédentes observations faites sur le rôle de TNF- α , à savoir sur l'angiogenèse par deux mécanismes, l'apoptose des péricytes¹⁵³ et la suppression de l'expression de l'Angiopoïétine-1 par le biais d'Angiopoïétine-2¹⁵⁴. Elle joue aussi un rôle dans l'hémostase avec l'induction de l'expression du facteur tissulaire circulante et endothéliale¹⁵⁵. Même si les mécanismes impliqués dans l'inflammation après l'implantation de LVAD sont

largement spéculatifs et peu explorés, l'activation des voies inflammatoires sur la surface du biomatériau a été proposée^{156,157}. L'un de ces mécanismes pourrait être la transition du flux sanguin de pulsatile à continu. Un autre mécanisme pourrait être le rôle de l'activation des plaquettes par les biomatériaux et l'augmentation du stress de cisaillement. En effet, l'activation des plaquettes induit la formation de conjugués plaquettes-neutrophiles qui ont été prouvés pour agir comme agents inflammatoires¹⁵⁸. En accord avec cette observation, l'implantation de LVAD a été associée à l'activation des cellules neutrophiles¹⁵⁹. L'inflammation chronique et la dysfonction immunitaire menant à l'activation des neutrophiles peuvent contribuer à la dysfonction endothéliale à travers une série de mécanismes complexes et interconnectés. En effet, dans les conditions inflammatoires chroniques, les neutrophiles activés subissent un processus appelé "amorçage", qui les rend plus réactifs et adhérents en particulier aux cellules endothéliales activées, initiant leur recrutement sur le site de l'inflammation. En parallèle, les médiateurs de l'inflammation peuvent directement endommager les cellules endothéliales, promouvoir l'inflammation dans les tissus environnants et induire un passage à un état pro-thrombotique dans l'endothélium, augmentant le risque de thrombose. La libération de ROS par les neutrophiles activés peut également endommager directement les cellules endothéliales, altérant leur fonction et favorisant la dysfonction endothéliale. L'un des marqueurs de la sécrétion des neutrophiles, la neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), semble impliquée dans les complications post-implantation, puisque son taux plasmatique est plus élevé chez les patients ayant développé une insuffisance cardiaque du ventricule droit après l'implantation d'un LVAD. En effet, un niveau de NGAL supérieur à 100 ng/mL était associé à une insuffisance du ventricule droit (VD) dans 93,3% des cas, tandis qu'un NGAL inférieur à 100 ng/mL était associé à seulement 40,0% de probabilité de développer une insuffisance du VD¹⁶⁰. De plus, il a été récemment décrit que le NGAL augmentait après l'implantation de LVAD en relation avec une dysfonction rénale¹⁶¹.

Ces études montrent que les patients en insuffisance cardiaque avancée ont un milieu pro-inflammatoire chronique. Ces derniers, pour permettre la régénération des tissus cardiaques, sont implantés avec un LVAD à flux continu, améliorant leur pronostic vital.

Mais en cas d'une implantation de longue durée comme une DT ou un BTT supérieure à 3 mois, l'état inflammatoire de ces patients s'aggrave.

Jusqu'à cette thèse, il n'y a pas eu d'études sur de l'inflammation des patients implantés avec un TAH Aeson de Carmat, ou même avec d'autres cœurs artificiels totaux.

Hémorragies

L'hémorragie précoce est souvent une conséquence de l'intervention chirurgicale, mais la dysfonction plaquettaire spécifique aux LVAD¹⁵⁸ et les altérations du site d'adhésion du VWF¹⁶² peuvent être visibles dès les premières 24h de support avec le LVAD¹⁶³.

Acteurs du saignement dans les MCS : rappels physiologiques

Le facteur von Willebrand (VWF)

Le facteur von Willebrand est une protéine jouant un double rôle dans l'hémostase primaire, en provoquant l'agrégation des plaquettes sur le site de lésion et dans l'hémostase secondaire avec son rôle de transporteur de facteur VIII du foie (où le facteur VIII est synthétisé) vers les sites de lésions.

Cette protéine est synthétisée en forme monomérique dans les cellules endothéliales et dans les mégacaryocytes, avec une longueur de 2813 acides aminés.

La première séquence de cette protéine a été identifiée en 1986 et plusieurs domaines répétables ont été identifiés, le premier modèle était le suivant : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C1-C2-CK¹⁶⁴ ; ce modèle est très largement répandu dans la littérature, mais au fur et à mesure des études, ce modèle est amené à disparaître pour évoluer vers des modèles plus précis, avec la disparition du domaine B-C en domaine C pour devenir comme suit : D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK¹⁶⁵ (figure 11)

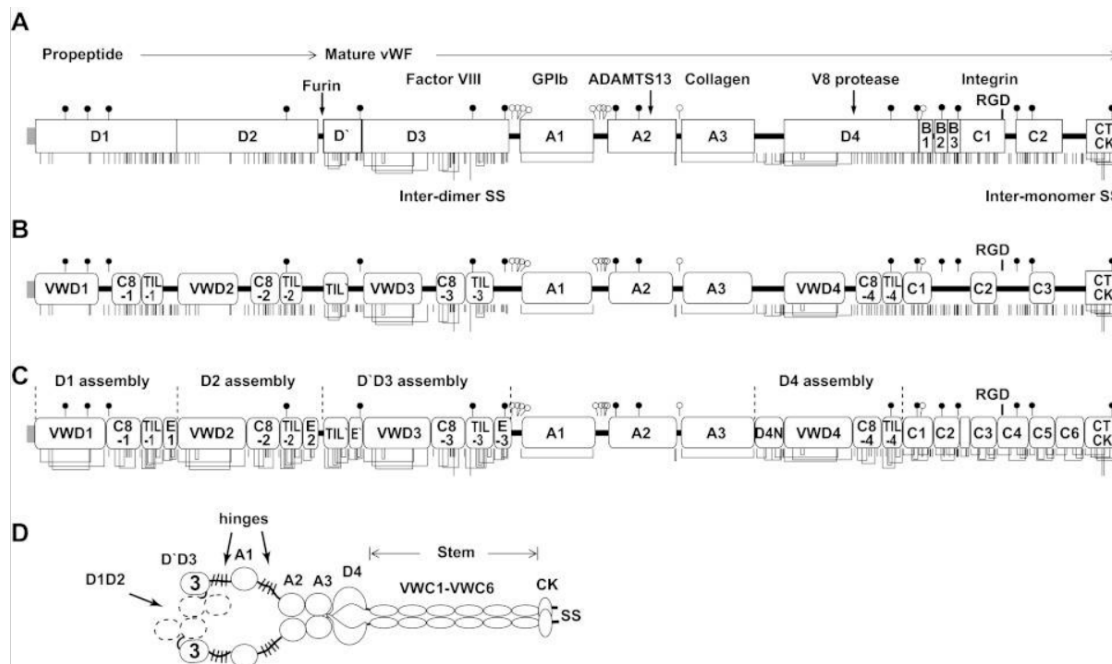


Figure 11 : Domaine VWF annoté : Les cystéines sont représentés par des traits verticaux pour montrer les potentiels formations de ponts disulfures au moment de la multimérisation^{166,167} entre 2 à 60 sous-unité. A : Représentation la plus répandue dans la littérature. B : Représentation des domaines protéiques en fonctions des régions d'homologies de séquence. C : Nouvelles représentation selon Zhou et al (2012)¹⁶⁵. D : Représentation du dimère de VWF en milieu acide similaire à celui présent dans l'appareil de Golgi.

Elle se multimérisé dans le réticulum endoplasmique¹⁶⁸. Elle possède plusieurs domaines qui joueront différents rôles, le domaine A1 de la protéine se lie au domaine GPIb α des plaquettes. Le domaine D'D3 se lie au facteur VIII, qui permettra au VWF de jouer son rôle de transporteur du facteur antihémophilique A. Elle se dimérise dans un premier temps dans l'appareil de Golgi où elle pourra ensuite se multimériser au fur et à mesure de sa maturation, jusqu'à atteindre une taille de 20kDa¹⁶⁹ (figure 12).

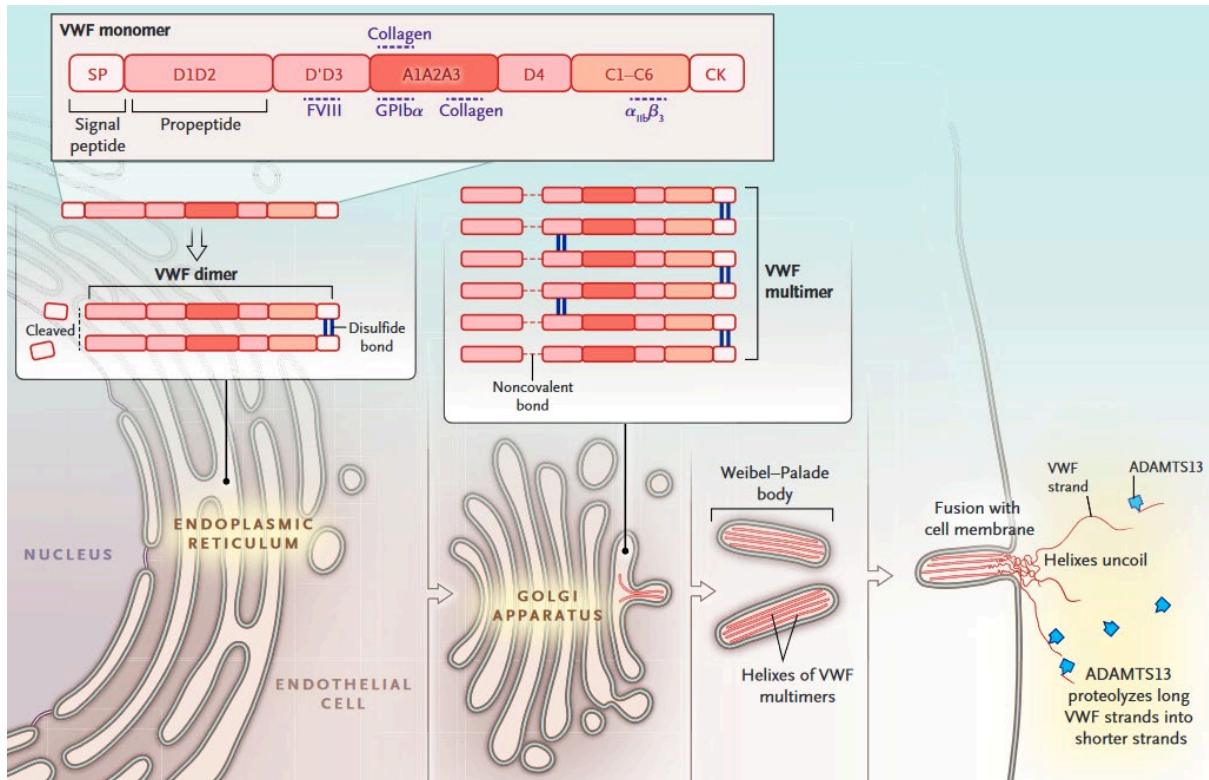


Figure 12 : Synthèse du facteur von Willebrand simplifiée, de sa synthèse à sa sécrétion dans le plasma en passant par les étapes de dimérisation dans le réticulum endoplasmique et de multimérisation dans l'appareil de Golgi et le stockage des multimères dans les corps de Weibel-Palade.

Tandis que les α -granules libèrent principalement les VWF au moment de l'activation plaquettaire, les cellules endothéliales libèrent les VWF de manière basale et régulée, mais il n'est pas encore déterminé par quel mécanisme la majorité des VWF sont sécrétés. Actuellement l'hypothèse la plus admise est que le VWF est majoritairement sécrété de manière constitutive des corps de Weibel-Palade^{170,171}. L'exocytose de la majorité des VWF se fait de manière aléatoire, un pattern est néanmoins visible, l'ancrage, l'amarrage, l'amorçage et la fusion et une série de protéines intracellulaires ont été identifiées (RalA, Rab3, Rab27a, Rab15, Rab33a, Rab37, Munc13-4, Munc18c, Slp4a, Annexin A2-S100A10, syntaxin-binding protein 1, syntaxin-4, VAMP-3, protéine G) par le biais d'expérience où leur déplétion/mutation modulent l'exocytose constitutive et/ou régulée¹⁷²⁻¹⁷⁴.

Une fois libérés le plasma, les multimères de VWF auront une demi-vie allant de 4.2 à 26 heures selon les individus, observé chez des individus traité à la desmopressine, une molécule synthétique mimant la vasopressine, induisant la libération de FVIII et de VWF.^{168,175} Cette différence de temps de clairance est potentiellement due à la différence de glycosylation selon les individus, mais la raison majeure de cette différence est aussi due au groupe sanguin. En effet, les groupes non O ont une demi-vie de VWF plus élevée que celles des individus O, de plus, le taux de VWF est généralement plus élevé pour les individus non-O¹⁷⁶. De plus au niveau cellulaire, des études montrent que la clairance du VWF est aussi lié à l'activité de macrophages¹⁷⁷, si ces derniers ne sont plus actifs, le temps de demi-vie des VWF augmente¹⁷⁸.

Le VWF est capable de se lier à plusieurs protéines avec ses différents domaines, certaines sont bien connus car lié à son rôle de protéine transporteuse, voici un tableau récapitulatif de ses différentes interactions (tableau 7)¹⁷⁹.

Nom	Domaine de liaison	Site d'interaction	Référence
VWF propeptide	D'-D3	Cellules endothéliales, plaquette	180
FVIII	D'-D3	Flux sanguin	181
P-selectine	D'-D3	Cellules endothéliales	182
β_2 -Integrine	D'-D3, A1, A2, A3	Leucocytes	183
Glycoprotéine Ib α	A1	Plaquettes	184
Osteoprotégérine	A1	Flux sanguin, cellules endothéliales	185
β_2 -Glycoprotéine	A1	Flux sanguin	186
PSGL-1	A1	Leucocytes	183
Collagène VI	A1	Matrice subendothéliale	187
ADAMTS-13	A1,A2,A3,D4	Flux sanguin	188
Collagène I	A3	Matrice subendothéliale	189
Collagène III	A3	Matrice subendothéliale	189
Thrombospondine	A3	Flux sanguin	190

IGFBP7	D4-CK	Flux sanguin, cellules endothéliales	191
$\alpha_{11b}\beta_3$	C4	Plaquettes	192
$\alpha_v\beta_3$	C4	Cellules endothéliales et tumorale	192
Fibrin	C1-6	Thrombus	193
CTGF/CCN2	CK	Cellules endothéliales	194
Galectine-1	Glycane	Flux sanguin, cellules endothéliales	195
Galectine-3	Glycane	Flux sanguin, cellules endothéliales	195
Siglec-5	Glycane	Macrophages	196
Angiopoïétine -2	inconnu	Flux sanguin, cellules endothéliales	197
Interleukine-8	inconnu	Cellules endothéliales	198
LRP1	inconnu	Macrophages	178,199

Tableau 7 : Les protéines humaines ligands du facteur von Willebrand : CK, cysteine knot; CTGF/CCN2, connective tissue growth factor; IGFBP7, insulin-like growth factor binding protein-7; LRP1, LDL receptor-related protein 1; PSGL-1, P-selectin glycoprotein ligand-1.

Ce tableau dépeint les interactions du VWF avec plusieurs protéines cellulaires, pouvant déterminer ses différentes interactions avec des protéines sanguines et cellules. ADAMTS13 qui est une métalloprotéase va donc protéolyser VWF en des multimères de plus petites tailles. Avec les plaquettes, VWF peut les lier et les amener à adhérer aux sites de lésions du subendothélium en se liant aux collagènes de type I et III, et ainsi induire leur agrégation.

Dans mon laboratoire d'accueil, il a été montré un lien entre l'activité du VWF à se lier au collagène (VWF:CB) et la sévérité des patients COVID-19 et être une cible thérapeutique potentielle à cause du rôle de VWF dans la formation de microthrombose observées chez ces patients.

Cette protéine est au cœur des maladies de Willebrand (VWD), il en existe de différents type, liées au type d'altération du VWF. Un défaut de synthèse, de sécrétion ou une clairance augmenté amène un déficit du taux de VWF, ces altérations sont dites « Maladie de Willebrand de type I ». Pour une mutation du VWF qui affecte une des fonctions de la protéine, que ce soit sa capacité à lier le collagène, les plaquettes, ou le facteur VIII, elle est dite « Maladie de Willebrand de type II ». Dans le cas où la protéine VWF n'est pas synthétisé (avec un taux de VWF plasmatique indétectable), elle est dite « maladie de Willebrand de type III ». Il existe un dernier cas de VWD mais elle n'apparait que dans un cas particulier, le syndrome de Willebrand acquis (AVWS en anglais), où le patient est implanté avec un MCS, notamment les HeartMate II et 3²⁰⁰.

Plaquette

Les plaquettes sont des cellules liées à l'hémostase primaire. Ce phénomène regroupe les étapes permettant l'arrêt d'une hémorragie par la formation d'agrégat plaquettaire sur le site de lésion (figure 13), l'activation plaquettaire, la sécrétion, l'adhésion et l'agrégation.

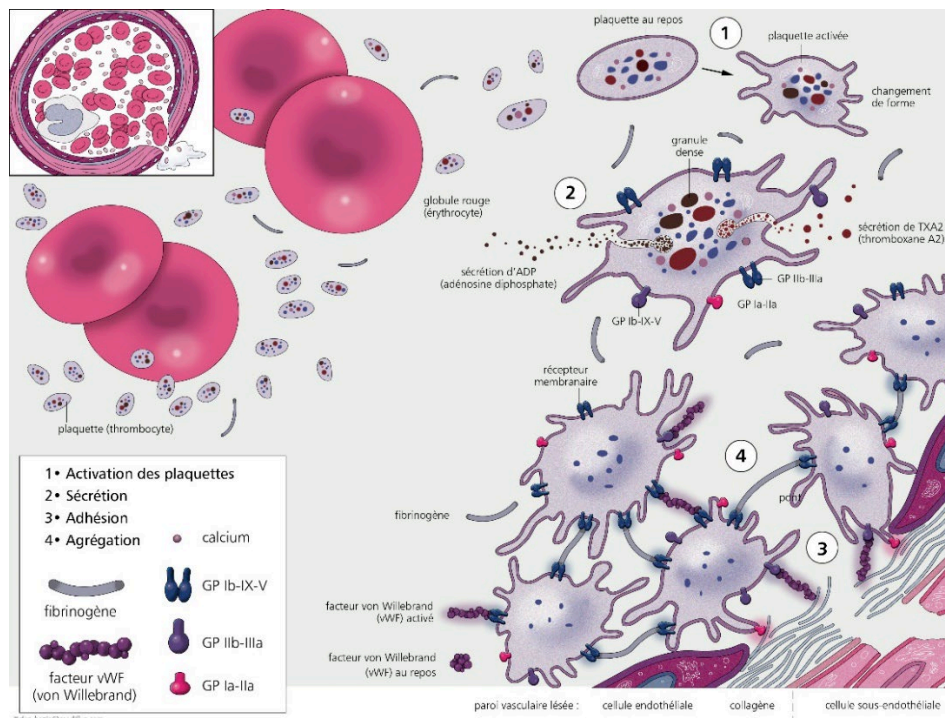


Figure 13 : représentation de l'hémostase primaire²⁰¹

En plus de cette fonction, ces cellules sont capables de s'activer sur des surfaces synthétiques ou des tissus étrangers, mais aussi par des forces de cisaillements élevées, suffisantes pour dégrader les plaquettes. Dans le cas d'une implantation avec une MCS, les forces de cisaillements ne sont généralement plus les mêmes qu'à l'état physiologique car plus élevées. Comme pour l'hémolyse, des forces de cisaillements trop élevées peuvent dégrader les plaquettes, mais si elles ne sont pas détruites, elles peuvent être activées.

L'activation plaquettaire dans ce cas entraîne la formation d'un thrombus plaquettaire qui va provoquer une diminution des plaquettes dans le sang, ce qui a terme va provoquer l'effet inverse, une thrombopénie et des risques hémorragiques²⁰². De plus, leur activation induit aussi la formation de complexes plaquettes-neutrophiles, liés à l'apparition de défaillance d'organe²⁰³. Différents traitements sont possibles pour contrebalancer ces effets délétères. En effet, les patients implantés sont sous traitement antithrombotique et anti-agrégant plaquettaire. L'héparine (HNF ou HBPM), en relai des antagonistes à la vitamine K (AVK) sont utilisés pour stopper la réaction thrombotique. En traitement anti agrégant plaquettaire, le patient sous VAD est mis sous aspirine²⁰². Pour les patients implanté avec le TAH Aeson de Carmat, les patients sont aussi mis en traitement antiagrégant avec de l'aspirine et antithrombotique avec de l'héparine de bas poids moléculaire (HBPM), puis les traitements sont réduits, avec le retrait du traitement à l'aspirine après les six premiers mois d'implantation²⁰⁴.

De réels défis surgissent dans un sous-ensemble significatif d'individus qui développent des saignements muqueux récurrents, ce qui est immédiatement apparu comme une cause pertinente de morbidité pour les LVAD à flux continu (CF) pendant la période de transition clinique à partir des dispositifs pulsatoires. Les saignements gastro-intestinaux ont augmenté de façon significative, passant de 0,068 EPPY dans les LVAD pulsatiles à 0,63 EPPY dans les CF-LVAD²⁰⁵.

Des saignements microscopiques ont été trouvés chez 19-40% des patients implantés avec un CF-LVAD HMII^{83,206} et environ 30% des patients dans l'étude initiale pour les LVAD Heartware®LVADs²⁰⁷. Une comparaison directe entre les LVAD HMII et Heartware® montre des taux similaires de complications hémorragiques précoces et tardives²⁰⁸.

Les saignements gastro-intestinaux chez les patients implantés avec un LVAD HM3 sont réduits par rapport à ceux avec un LVAD HMII à 2 ans (0,61 EPPY vs. 0,95 EPPY, taux relatif = 0.64)⁹⁰ et à 5 ans (0,25 EPPY vs. 0,42 EPPY, taux relatif 0,60)²⁰⁹, mais ils restent néanmoins un cas tête Clinique, soulignant les faibles améliorations obtenues dans ce domaine jusqu'à maintenant. À ce jour, les stratégies pour prédire de tels événements indésirables restent inefficaces²¹⁰ et la gestion des patients ne repose uniquement que sur l'ajustement empirique de l'anticoagulation et le traitement local²¹¹. Les saignements peuvent survenir n'importe où le long du tractus gastro-intestinal, mais ils sont le plus souvent localisés dans le haut du tractus gastro-intestinal dans 35% à 50% des cas, dans la partie inférieure du tractus gastro-intestinal dans 22% des cas, et dans l'intestin grêle dans environ 15% des cas²¹². Les saignements occultes sans source identifiable sont fréquents et surviennent dans 20% à 44% des cas. Les malformations artério-veineuses (AVM) sont responsables de plus de la moitié des lésions, suivies de gastrite et de maladie ulcéreuse gastroduodénale. D'autres zones de saignements muco-cutanés comprennent les saignements naso-pharyngés, buccaux et vaginaux. Les patients du groupe sanguin O ont des niveaux de VWF et de FVIII environ 25% plus faibles que les patients du groupe non-O (A, B ou AB) comme l'ont précédemment rapporté Gill JC et al.²¹³, et sans surprise, le groupe sanguin O a été trouvé être significativement associé à un risque plus élevé de saignement (risque 2.42 [95% CI 1.03-5.70], $p = 0.044$)²¹⁴. À ce jour, la warfarine reste le traitement de référence pour l'anticoagulation des LVAD tout en maintenant l'INR entre 2 et 3. Peu de données sont disponibles pour montrer sa capacité à abaisser l'INR des patients HM3 (INR entre 1.5 et 1.9)²¹⁵ tandis que des essais sont en cours sur l'administration d'aspirine à 100mg quotidiennement comparé à un traitement placebo (Essai clinique ARIES, NCT04069156)²¹⁶.

Les produits sanguins (DDAVP, cryoprécipités, concentrés de Vwf) sont rarement utilisés et sont limités dans les situations mettant la vie du patient en danger car il est possible d'obtenir un phénomène de rebond pro-coagulant alors que le patient est encore implanté avec le LVAD. Généralement, le patient subit une endoscopie supérieure et inférieure avec administration d'une thérapie locale si une source de saignement est identifiée avec une suspension temporaire de la warfarine jusqu'à obtenir un maintien de l'équilibre hémostatique. L'aspirine est généralement interrompue pendant 30 à 90 jours. L'Octreotide

et les inhibiteurs ACE/Antagoniste des récepteurs de l'angiotensine (ARAI, ARB en anglais) ont été largement adoptés comme thérapies d'appoint. L'octreotide et les inhibiteurs de l'ECA/les ARB ont été largement adoptés comme thérapies d'appoint. En cas de saignement gastro-intestinaux récurrents avec de nouvelles manifestation d'AVM, la thérapie locale joue toujours un rôle, les agents de deuxième ligne (digoxine orale, thalidomide) peuvent être introduits en plus de la diminution de la cible INR. De nombreux autres médicaments ont été utilisés sur la base de preuves limitées et ne sont actuellement pas recommandés par les meilleures directives de pratique, par exemple la Desmopressine (utilisée chez les patients atteints d'hémophilie A/maladie acquise du VWF, pour augmenter les niveaux de facteur VIII et la sécrétion de VWF), la doxycycline (destinée à inhiber l'activité ADAMTS-13)²¹⁷ la supplémentation en Oméga-3 (en raison des propriétés anti-inflammatoires/anti-angiogéniques générales)²¹⁸ et le Bevacizumab (anticorps monoclonal spécifique du VEGF)²¹⁹. En raison des forces de cisaillement drastiquement élevé dans le sang propulsé par LVAD, les efforts pour identifier les causes sous-jacentes des saignements muqueux induits par LVAD se sont rapidement concentrés sur le VWF et son interaction avec les plaquettes. Les altérations du VWF associés à l'implantation de LVAD sont collectivement appelés AVWS (pour acquired von willebrand syndrome)²²⁰, une condition qui est initialement trouvée chez les patients atteints de sténose valvulaire aortique (syndrome de Heyde)²²¹. L'AVWS associé au LVAD est défini par un manque de multimères de VWF de haut poids moléculaire et une baisse de son activité adhésive dans les prélèvements de sang périphérique des patients implantés avec un LVAD. Il se développe peu après l'implantation de LVAD²²², Il se développe peu après l'implantation de LVAD²²¹ et ce syndrome n'est pas observé chez les receveurs de greffe de cœur,²²⁰ suggérant qu'il est causé par des changements hydrodynamiques induits par le dispositif mécanique. En effet, la perte de multimères HMW dans le sang humain après l'implantation de LVAD a été observée après la mise en route de la pompe après 5 minutes par le groupe du Pr Susen²²². Cette perte instantanée/rapide de multimères HMW après induction d'un stress de cisaillement élevé chez les patients implanté avec un HMII a été confirmée in vitro avec le ce dispositif. La perte de multimères HMW a également été significativement diminuée après 5 minutes²²² et leur récupération rapide dans un modèle de lapin de sténose artérielle réversible²²².L' AVWS pourrait être causé par des forces de cisaillement élevées, un écoulement longational (gradients de débit dans le sens de

l'écoulement), une réduction de la pulsabilité, ou une turbulence de l'écoulement¹²². Une croyance largement répandue est que les forces de cisaillement élevées du flux sanguin propulsé par LVAD provoque une AVWS en augmentant le clivage de VWF par la métalloprotéase ADAMTS-13. Cependant, ce mécanisme hypothétique n'est pas entièrement soutenu, et plusieurs lacunes significatives demeurent. Premièrement, une AVWS est observée chez presque tous les patients, mais seulement 10 à 20 % des patients saignent²⁰⁸. Deuxièmement, on sait que les forces de cisaillement élevées induisent le clivage du VWF par l'ADAMTS-13^{223,224} diminuant ainsi l'activité adhésive du VWF, mais il a également été montré qu'il active le VWF pour lier les plaquettes bien avant que l'ADAMTS-13 ne soit découvert²²⁵⁻²²⁷. Le clivage et l'activation des multimères de VWF peuvent être induits in vitro entre environ 100 à 800 dynes/cm² de forces de cisaillement,^{99,228-231} soulevant des questions quant à la façon dont les deux processus opposés atteignent un état d'équilibre chez les sujets sains et si cette homéostasie du VWF est perturbée par le flux sanguin dérivé de LVAD. Enfin, un clivage excessif du VWF n'a jamais été directement détecté dans les échantillons de sang périphérique des patients implantés avec un LVAD en utilisant des tests de laboratoire conventionnels. C'est parce que ces tests conventionnels mesurent le clivage du VWF par western-blot non ou semi-quantitatif²³² avec des marqueurs de substitution, tels que la liaison du VWF au collagène²³² et du taux antigénique d'ADAMTS-13, ou par le clivage d'un recombinant de 73mers du domaine A2 du VWF^{233,234}. Le test de clivage de peptides est quantitatif, mais il ne mesure pas le clivage du VWF chez les patients implantés avec LVAD. Plusieurs éléments suggèrent que le VWF chez les patients LVAD est plus susceptible d'être activé que d'être excessivement clivé :

- (1) des forces de cisaillement élevés déplient le VWF pour oxydation²³⁵ dans un contexte d'un environnement avec un stress oxydant actif chez les patients LVAD^{141,236,237}. L'oxydation de la méthionine rend le VWF résistant au clivage^{235,238} et l'ADAMTS-13 est moins active dans son activité de clivage du VWF²³⁹.
- Les LVAD induisent souvent une hémolyse, libérant de l'hémoglobine qui se lie au VWF et bloque son clivage par l'ADAMTS-13^{229,240}.
- Les domaines A1 et A2 du VWF plasmatique forment un complexe pendant l'homéostasie pour empêcher le VWF d'activer les plaquettes ou d'être clivé

par l'ADAMTS-13²⁴¹. Ce complexe se forme lorsque les deux cystéines voisines, C¹⁶⁶⁹ et C¹⁶⁷⁰, dans le domaine A2 sont sous une forme réduite mais se dissocie lorsque les cystéines voisines^{242,243} ou les résidus méthionine près de l'hélice C-terminale sont oxydés²⁴⁴. La dissociation du complexe A1-A2 expose A1 pour lier les plaquettes²⁴³, mais elle peut ne pas faciliter le clivage du domaine A2 car l'oxydation de Met¹⁶⁰⁶ rend le VWF résistant au clivage^{235,238} ce qui entraîne l'accumulation de VWF hyperadhésif dans la circulation sanguine.

- Il y a une hausse significative du taux de VWF liés aux vésicules extracellulaire plaquettaires (PEV) dans le sang périphériques des patients implantés avec un LVAD²⁴⁵, suggérant que les VWF sont activés pour se lier et activer les plaquettes. Une note intéressante est que ces vésicules extracellulaires dérivées des plaquettes et liées au VWF favorisent une angiogenèse surexprimée²⁴⁵, qui est la base structurelle de l'angiodyplasie qui se développe dans le tractus gastro-intestinal et d'autres tissus muqueux des patients LVAD et est un site commun de saignement après retrait du LVAD²⁴⁶. Ces observations démontrent l'importance de quantifier l'activité et le clivage du VWF chez les patients LVAD. Nous avons développé une méthode de spectrométrie de masse pour quantifier le clivage du VWF en détectant les peptides tryptiques clivés par l'ADAMTS-13 EQAPNLVY ou MVTGNPASDEIK du domaine A2. En utilisant cette méthode, nous avons montré que les multimères de VWF sont excessivement clivés chez certains patients mais activés pour se lier aux plaquettes chez la plupart des patients implantés LVAD^{234,245,247}. Ce test peut être utilisé pour affiner la contribution du clivage du VWF au développement de l'AVWS et des saignements cliniques chez les patients LVAD dans de grandes études cliniques.

Les saignements dans le Syncardia sont également un des événements indésirables clinique courant qui sont rapportés dans 43% des patients ²⁴⁸. Sénage et al. ont rapporté que 22% des patients sous Syncardia ont nécessité une chirurgie pour arrêter les saignements tandis que Copeland et al. ont rapporté que 25% des patients ont eu une médiastinoscopie

pour détecter des hémorragies^{248,249}. La plupart des épisodes hémorragiques surviennent dans les 24 heures suivant l'opération d'implantation, avec une mortalité de 44% chez ceux qui ont dû avoir une ré-opération. Cependant, les saignements observés chez les patients avec le TAH Aeson ne semblent pas être un résultat significatif¹⁰⁰ et les essais cliniques en cours pourraient fournir une conclusion plus définitive. En contraste avec les études approfondies sur les patients LVAD, il y a des peu de données sur la façon dont l'implantation de TAH affecte le clivage et l'activité du VWF et elles sont contradictoires. En effet, Une étude de Zieger et al a noté l'absence d'AVWS après l'implantation de Syncardia²⁵⁰ mais deux autres études montrent la perte de grands multimères de VWF chez les patients avec Syncardia^{251,252}. Le rôle de la dysfonction plaquettaire et du VWF dans les événements indésirables hémorragiques durant le support avec un LVAD est plus associatif qu'une claire corrélation entre ces 2 dysfonctions. Plusieurs propositions pour individualiser les soins pourraient être faites dans les futurs essais cliniques :

- Évaluation du risque de saignement : Il est essentiel d'évaluer le risque de saignement pour chaque patient LVAD en fonction des facteurs individuels, y compris les caractéristiques démographiques du patient, les comorbidités, les troubles hémorragiques préexistants, et les profils de base des plaquettes et de la coagulation. Cette évaluation peut guider la sélection de traitements appropriés anticoagulant et antiplaquettaires.
- Surveillance de la fonction des plaquettaire et du VWF : Une surveillance régulière de la fonction des plaquettes et du VWF peut fournir des informations précieuses sur l'état de l'hémostase du patient. Des ajustements à l'anticoagulation et à la thérapie antiplaquettaire peuvent être faits en fonction de ces résultats de surveillance. Le retrait de traitement antiplaquettaire pourrait être proposé et est actuellement testé dans l'étude ARIES²¹⁶.
- Nouvelles thérapies : Un anticorps anti-VWF bloquant partiellement les interactions VWF-ADAMTS13 et pouvant prévenir la dégradation excessive des multimères HMW-VWF a été proposé. Cette stratégie peut être utilisée pour le développement d'options thérapeutiques pour traiter les épisodes de

saignement dus à la dégradation du VWF dépendante des forces de cisaillement pendant l'implantation avec le LVAD²⁵³

Finalement, la responsabilité de l'anticoagulation dans les complications hémorragiques après l'implantation de LVAD ou de TAH est cruciale pour la gestion de ces complications potentielles (**Tableau 8**).

	Traitement antithrombotique	Initiation	Durée/surveillance
LVAD	Héparine non fractionnée (UFH)	Dès que le drain permet l'anticoagulation	Arrêt dès INR >2
	Warfarine	Après retrait du drain	2<INR<3 traitement à long terme
	Aspirine	Après J 2 de support	Traitement à long terme
Syncardia	UFH	Après la chirurgie, le plus tôt possible	Arrêt dès INR >2
	Warfarine	Après retrait du drain	2.5<INR<3.5 Traitement à long terme
	Aspirine	Après J 2 de support	Traitement à long terme
Aeson	UFH	Dès que le drain permet l'anticoagulation	Avec anti-Xa aux alentours de 0.2, jusqu'au retrait du drain
	Héparine de bas poids moléculaire (LMWH)	Après retrait du drain	Pas de suivi biologique, Traitement à long terme
	Aspirine	Au moins 4 jours après le retrait du drain	Traitement à long terme

Tableau 8: Recommandation des traitements antithrombotiques chez les LVAD et TAH

L'utilisation de traitement antithrombotique est un pilier dans la gestion des patients sous MCS pour diminuer le risque de complications thromboemboliques associées à la mauvaise hémocompatibilité de ces dispositifs. Pour la plupart des MCS à long terme, un

agent antiplaquettaire, comme l'acide acétylsalicylique, et un antagoniste de la vitamine K (AVK) sont utilisés à des doses thérapeutiques. Récemment, HM3 a démontré une hémocompatibilité accrue avec une réduction significative de la thrombose de la pompe mais avec un risque persistant de complications hémorragiques. Une anticoagulation de faible intensité ciblant une INR entre 1,5 et 1,9 a été testée dans l'étude MAGENTUM 1 (Minimal Anticoagulation Evaluation To Augment hemocompatibility) sans aucune augmentation des événements^{215,254}. Les saignements dans un LVAD sont probablement un mélange entre l'anticoagulation, mais aussi l'AVWS, qui commence directement après l'implantation du LVAD. Les taux de thrombose rapportés, y compris les accidents vasculaires cérébraux et les embolies périphériques sont d'environ 16 % pour un cœur artificiel total temporaire à pompe pneumatique (SynCardia), même avec de fortes doses d'anticoagulation orale²⁵⁵. Aucune thrombose, y compris les accidents vasculaires cérébraux et les embolies périphériques, n'a été signalée dans les essais cliniques d'Aeson. Les patients implantés avec Aeson ne saignent pas autant que ceux avec Syncardia, mais c'est probablement un mix de la faible utilisation d'anticoagulation²⁵⁶ résultant de l'hémocompatibilité totale du dispositif, des différences entre les valves mécaniques dans Syncardia et les valves bioprothétiques d'Aeson, de sa pulsatilité et aussi de l'absence de forces de cisaillement significativement trop fortes à l'intérieur des ventricules. Ainsi, en raison de ces grandes différences, il est impossible de dire si l'anticoagulation peut faire partie du processus de saignement.

Les accidents vasculaire cérébraux liés aux MCS

Les accidents vasculaires cérébraux (AVCs) sont des évènements indésirables majeures observés chez les patients implantés avec un LVAD, ils sont catégorisés comme accident ischémique transitoire (AIT), AVC ou AVC invalidant en fonction des séquelles et de la clinique du patient. En 2022, INTERMACS rapporte au totale un taux d'AVC à 7% durant la première année d'implantation avec des différences significatives sur les différents dispositifs²⁵⁷. La thérapie anticoagulante et antiplaquettaire devrait être suspendue le temps

de déterminer si les lésions cérébrovasculaires n'ont provoquées aucune hémorragie, tandis que la décision si la coagulation doit être inverser doit être prise avec la neurologie et par une évaluation neurochirurgicale au cas par cas en raison des données limitées à disposition²⁵⁸. L'anticoagulation est généralement rétablie a des cibles INR plus faibles tandis que l'anticoagulation est interrompue²⁵⁹. L'apparition des LVAD de troisième génération (dans notre cas, les HM3) a permis d'observer des réduction significatives de l'incidences des AVC, même s'ils restent une part importante des causes de décès des patients LVAD (jusqu'à 19%)²⁶⁰. Les taux d'AVC à 2 ans étaient de 0,04 EPPY et 0,07 EPPY respectivement pour HM3 et HMII (p= 0,008), et à 5 ans, ils étaient de 0,05 EPPY et 0,136 EPPY respectivement pour HM3 et HMII (p<0,001), en ce pendant les mêmes traitements antithrombotiques (en somme avec aspirine dosée entre 81mg-325mg par jour et warfarine avec une INR cible entre 2.0 et 3.0), comme décrit dans le **tableau 9**.

	Heartmate II	Heartmate 3	Valeur p
AVC durant 2 ans	0.07	0.04	P=0.008
AVC durant 5 years	0.136	0.05	P< 0.001
Autres évènements neurologiques	0.073	0.065	P=0.49
Thrombose de la pompe durant 5 an	0.108	0.010	P< 0.001
Hémorragies durant les 5 ans			
N'importe quel saignement	0.765	0.430	P<0.001
Saignement gastro-intestinal	0.423	0.252	P<0.001

Tableau 9: Evènements indésirables lié à l'hémocompatibilité (HRAE) chez les patients implantés avec un LVAD à flux centrifuge (HM3) versus LVAD à flux axial (HMII) basée sur l'essai clinique MOMENTUM 3 avec les données de 2 et 5 années de support. L'incidence est exprimée par EPPY (évènements par patient/an). Les données résumées ici sont issues de l'essai clinique MOMENTUM 3. ^{90,209}

La physiopathologie des AVCs reste néanmoins peu comprise et peut être le résultats de facteurs concomitants, par exemple, la thrombogénicité intrinsèque des LVADs à cause du contact du sang avec les matériaux, l'anticoagulation chronique chez les populations à risque et la rhéologie liée aux modification des forces de cisaillement : hématie, plaquettes et VWF.

. La technique d'implantation chirurgicale et la variante anatomique de la position de la conduite d'éjection du greffon peuvent jouer un rôle dans la hausse des forces de cisaillement²⁶¹. Les facteurs de risques accrues d'AVC chez les patients LVAD sont le sexe féminin, la fibrillation auriculaire, des antécédents d'AVC, l'hypertension, la bactériémie, la thrombose de la pompe, les saignements gastro-intestinaux et le type du LVAD implanté²⁶². La gestion de l'anticoagulation chronique chez les patients LVAD est difficile à cause des saignements intrinsèques à la dysfonction plaquettaire et à l'AVWS. C'est particulièrement significatif chez les patients avec des saignements gastro-intestinaux qui nécessiteraient une diminution de leur INR et un arrêt temporaire voir permanent de leur traitement antiplaquettaire. De plus, les patients dans un état avancé d'insuffisance cardiaque (condition sous-jacente à l'implantation d'un LVAD) ont un risque accru d'AVC, estimé entre 0.013 et 0.035 EPPY²⁶³. Un lien entre infection et AVC a été confirmé par Aggarwal²⁶⁴, suggérant que les état d'hypercoagulabilité peuvent évoluer vers des évènements thromboembolique en présence d'éléments déclencheurs spécifique (par exemple les infections). La tendance à administrer des doses faibles d'anticoagulants en ciblant de faibles niveaux d'INR²⁶⁵ chez les patients implanté avec des LVAD de deuxième génération a été abandonnée après une soudaine augmentation de l'incidence de thrombose de la pompe comme rapporté par Starling⁸⁷, Kirklin⁸⁸ mais aussi chez Najjar²⁶⁶. Comme les AVC dans les LVADs pouvant être ischémique ou hémorragique, la prise en charge est similaire à celle des patients sans LVAD, une IRM est effectuée pour déterminer la nature sous-jacente de l'hémorragie.

Infection

L'infection du câble dans un LVAD peut entraîner de graves conséquences pour la santé du patient. Il est essentiel de traiter rapidement toute infection associée à un LVAD pour minimiser ces risques. Les infections chez les patients implantés avec des VAD sont des évènements indésirables relativement communs qui peuvent repousser voir empêcher la transplantation d'un cœur²⁶⁷. Les infections liées au LVAD sont fréquentes et peuvent apparaitre après 1 mois d'implantation et le temps médian est quant à lui estimé à 225 jours post-implantation, mais elles ne sont pas nécessairement létales²⁶⁸.

Voici quelques-unes des conséquences possibles :

1. Infection locale : L'infection peut commencer au niveau du site d'implantation du câble du LVAD, généralement situé dans la région abdominale ou thoracique. Cela peut entraîner une inflammation, une rougeur, une douleur et une suppuration au niveau du site d'incision.
2. Infection systémique : Si l'infection locale n'est pas contrôlée, elle peut se propager à d'autres parties du corps, entraînant une infection systémique grave. Cela peut entraîner des fièvres, des frissons, une augmentation du rythme cardiaque et des symptômes généraux de septicémie.
3. Mauvais fonctionnement du LVAD : L'infection peut endommager le câble du LVAD ou d'autres composants du dispositif, entraînant un mauvais fonctionnement de l'appareil. Cela peut entraîner une diminution de la circulation sanguine assistée par le LVAD, aggravant l'insuffisance cardiaque sous-jacente et mettant la vie du patient en danger.
4. Formation d'abcès : L'infection peut entraîner la formation d'abcès autour du câble du LVAD, ce qui peut causer des complications supplémentaires.
5. Thrombose ou embolie : L'infection peut augmenter le risque de formation de caillots (thrombose) autour du câble du LVAD, ce qui peut bloquer le flux sanguin ou entraîner une embolie si les caillots se détachent.

La bactérie la plus commune responsable de ces infections est *Staphylococcus aureus*, plus communément appelé staphylocoque. Cette bactérie peut provoquer toutes sortes d'infections, allant des infections cutanées mineures, telles que les furoncles, jusqu'à des infections plus graves, comme la pneumonie, l'endocardite, ou la septicémie. La deuxième bactérie la plus commune, *Pseudomonas aeruginosa*²⁶⁸, peut causer une variété d'infections, notamment les infections des voies urinaires, les pneumonies (notamment chez les personnes sous ventilateurs), les infections des plaies (notamment chez les personnes brûlées) et les infections du sang. Dans le cas de patients implantés avec un VAD, dès que l'infection du câble d'alimentation est déclarée, ces derniers sont traités avec des

antibiotiques à large spectre, à cause du peu de données à ce sujet²⁶⁹. Un traitement par voie oral est alors entamé, par exemple avec de la doxycycline ou de la ciprofloxacine tout en traitant la plaie et en immobilisant le câble d'alimentation pendant 4 jours. Mais avant d'entamer ce traitement empirique, il est nécessaire d'effectuer des cultures avec des prélèvements des tissus proches du câble et du sang.

En cas d'une infection prolongée et commençant à se propager, il est nécessaire de réhospitaliser le patient et d'initier un traitement par intraveineuse avec d'autres antibiotiques à large spectre comme ceux déjà cités, ou encore la vancomycine, le tazobac ou encore la rifampicine mais il est également difficile de choisir un traitement en particulier à cause encore une fois d'un manque de données sur les infections de LVAD et se fait par intermittence en faisant varier les antibiotiques. La Rifampicine pourrait être efficace de par sa capacité à pénétrer et détruire les biofilms bactériens et peut être utilisé en complément avec d'autres antibiotique²⁷⁰ comme la ciprofloxacine déjà mentionnée pendant 14 jours. Néanmoins rifampicine est également connue pour interagir avec la warfarine et altérer la stabilité de l'INR. Le clinicien doit donc faire un choix entre le traitement antibiotique pouvant altérer la coagulation du patient, ou bien ne pas utiliser ce traitement, en sachant que les infections sont des facteurs de risque de saignements gastro-intestinaux. Dans le cas d'une complication prolongée de l'infection, le patient peut avoir à subir une intervention chirurgicale pour drainer les abcès durant la chirurgie, la plaie laissant passer le câble d'alimentation est débridée et nettoyé pour retirer les tissus infecté et une relocalisation du passage du câble d'alimentation peut être également faites pour laisser permettre le soin sur les tissus infecté et la cicatrisation de la plaie. À la suite de ce traitement, si le câble d'alimentation est relocalisé, un centre ajoute un autre traitement pour retirer l'infection sur la plaie ouverte laissant auparavant passer le câble d'alimentation, le traitement des plaies par pression négatives (NPWT), qui consiste à aspirer à travers la plaie, l'élément infectieux (biofilms). Cette méthode est appliquée dans les infection récurrentes qui n'ont pas encore atteinte le dispositif²⁷¹. Le temps médian de la procédure est de 9 jours (entre 5 et 16 jours)²⁷¹. Ce traitement dans la série de case report de Cikirikcioglu et al. montre une efficacité de 100% car 5 des patients traités par cette méthode ont pu être transplanté sans récurrence d'infection. Mais cette méthode reste à être mise à l'épreuve car le groupe de

patient traité est trop petit et il n'y avait aucune comparaison avec un groupe contrôle, donc ces résultats sont à relativiser.

Dans un case report plus récent de fin 2022 de l'équipe de Püschel et al²⁷², un patient de 57 ans implanté avec le LVAD HM3 s'est présenté avec une infection du câble d'alimentation. Ce n'était pas la première infection que le patient subissait. Malgré les traitements antibiotiques, l'infection de *Proteus Mirabilis* et *Staphylococcus Aureus* persistaient. Le patient a reçu un traitement chirurgical pour retirer les tissus infectés et l'équipe de Püschel et al. décide d'utiliser une approche moins conventionnelle en utilisant des bactériophages pour traiter l'infection du câble. En effet, après avoir fait des tests in vitro, le bactériophage avait un effet sur *Proteus Mirabilis* mais pas sur *Staphylococcus*. 20mL de bactériophages SniPha 360 (un cocktail de bactériophage lytique, SniPha 360, Sanubiom GmbH, Fritzens, Austria, Phage 24.com), efficace contre *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* et *Proteus mirabilis*. Cette solution a été appliquée sous forme de gel le long du câble d'alimentation après le débridement des tissus infectés. Le traitement bactériophage a été renouvelé et les traitements antibiotiques ont repris par voie orale avec le cotrimoxazole (aussi bien efficace contre *Proteus Mirabilis* et *Staphylococcus Aureus*). Le patient est resté hospitalisé 20 jours avant de retourner chez lui. Le patient est réadmis 2 mois plus tard, les cultures ne montrent la présence que de *Staphylococcus Aureus*, sans trace de *Proteus*. Bien que ces résultats soient concluants, ils ne montrent malheureusement pas l'efficacité du co-traitement bactériophage et antibiotique, mais cela reste une possible voie d'exploration pour de futurs traitements, nécessitant plus d'essais et plus une comparaison avec un groupe contrôle.

Objectifs de travail de la thèse

L'objectif de cette Thèse de Doctorat est d'approfondir notre compréhension des mécanismes permettant d'atteindre une hémocompatibilité du cœur artificiel total Aeson de Carmat et de la caractériser. L'hémocompatibilité est une des priorités les plus importantes à développer sur les dispositifs médicaux car elle permet de maintenir un équilibre hémostatique au contact du dispositif et une préservation des cellules circulantes. Néanmoins la conception de tels dispositifs médicaux assurant des fonctions biologiques primordiales comme la pompe cardiaque n'est pas chose aisée et nécessite une approche pluridisciplinaire car les caractéristiques biochimique et physique des matériaux utilisés, l'approche médicale de la procédure chirurgicale pour implanter le dispositif, couplé à l'hémodynamisme de la pompe de la prothèse doivent tous être pris en compte au moment de la conception d'une telle prothèse.

Dans le cadre de cette thèse, je me suis tout d'abord intéressé particulièrement à une protéine de l'hémostase : le facteur von Willebrand. Elle joue un rôle prépondérant dans l'hémostase pour sa capacité à lier et à activer les plaquettes. Une des premières étapes de cette thèse a été de mettre au point une méthode permettant d'analyser la répartition des multimères du facteur Willebrand circulant à partir d'un échantillon plasmatique. Grâce à cette technique, il était possible d'analyser les multimères du Willebrand ce qui nous renseigne sur l'état de cette protéine. Dans un second temps, nous avons évalué le degré de multimérisation du facteur Willebrand après implantation d'A-TAH dans l'étude de phase pivot.

Je me suis ensuite intéressé sur l'aspect inflammatoire et son potentiel développement au décours de l'implantation avec le cœur artificiel total Aeson toujours durant l'étude de phase pivot. En effet ce point traitera l'évolution des protéines inflammatoires et des populations immunitaires après implantation des patients avec le dispositif Aeson.

Résultats

- 3.1. Évaluation d'un test semi-automatisé de quantification des multimères du facteur von Willebrand. Evaluation of a semi-automated test for quantification of von Willebrand multimers.

Évaluation d'un test semi-automatisé de quantification des multimères du facteur von Willebrand.

Evaluation of a semi-automated test for quantification of von Willebrand multimers.

Christophe PERONINO¹, Nadia RIVET^{1,2}, Agnès VEYRADIER^{3,4,5}, Aurélien PHILIPPE^{1,2},
Bérangère S. JOLY^{3,4,5}, Anne-Céline MARTIN^{1,6}, Sophie LUNEAU^{1,2}, Pascale GAUSSEM^{1,2},
Nicolas GENDRON^{1,2}, et David M. SMADJA^{1,2}

¹Université Paris Cité, Innovative Thérapies in Haemostasis, INSERM UMR-S1140, F-75006 Paris, France

² AP-HP, Hôpital européen Georges Pompidou, Service d'Hématologie biologique, F-75015 Paris, France.

³ Centre National de Référence des MicroAngiopathies Thrombotiques

⁴ AP-HP Nord, Hôpital Lariboisière, Service d'hématologie biologique, F-75010 Paris, France.

⁵ Université Paris Cité, EA3518, Institut de recherche Saint Louis, Paris, France.

⁶ AP-HP, Hôpital européen Georges Pompidou, Service de chirurgie cardiaque- UMICS, F-75015 Paris, France.

Correspondance : Pr David M. SMADJA ; Inserm UMR-S1140, Téléphone : +33 1 56 09 39 33 ;

Email : david.smadja@aphp.fr

Résumé (max 250 mots):

Contexte : L'évaluation de la structure des multimères du facteur de von Willebrand (VWF) par une analyse de ses multimères offre des informations précieuses pour le typage de la maladie de Willebrand (VWD), en particulier les formes acquises après implantation d'une assistance circulatoire. Notre étude a pour objectif d'évaluer le dosage semi-automatique des multimères du VWF avec l'analyseur Sebia Hydrasys.

Méthodes : Nous avons réalisé une analyse rétrospective sur une collection d'échantillons de plasma de patients diagnostiqués à l'aide des panels de routine de référence. Notre analyse s'est concentrée sur l'évaluation de la quantification des multimères de VWF de haut poids moléculaire, de poids intermédiaire, et de faible poids. La migration électrophorétique a été réalisée avec le Hydrasys 2 scan et l'interprétation par analyse densitométrique à l'aide du logiciel Phoresis à l'Hôpital européen Georges Pompidou.

Résultats : L'Hydrasys scan 2 reproduit avec succès tous les profils de multimères attendus en fonction du type de VWD. L'analyse a clairement démontré que chez les patients avec assistance circulatoire, les niveaux élevés de VWF plasmatique rendent la migration non discriminante avec la méthodologie proposée par le fabricant. Ainsi, la dilution des échantillons de plasma, en tenant compte de la concentration plasmatique de VWF, ajustée à un taux antigénique de 100 %, permet d'améliorer la précision du gel. Nous proposons également d'utiliser un témoin standardisé le plasma CryocheckTM et avons établi des valeurs de référence.

Conclusion : Dans l'ensemble, ce système d'analyse des multimères de VWF semi-automatisé, standardisé et optimisé permet de révéler efficacement le profil multimérique du VWF.

Mots clefs : facteur von Willebrand, multimères de facteur von Willebrand, électrophorèse, assistance circulatoire mécanique, syndrome de Willebrand acquis

Abstract:

Background: Assessing the structure of von Willebrand factor (VWF) multimers through multimer analysis offers valuable insights for subtyping VWF disease (VWD), in particular in acquired von Willebrand syndrome due to mechanical circulatory support. This study aims to evaluate the Sebia Hydrasys Hydrigel semi-automated VWF multimer assay.

Methods: We retrospectively analyzed a collection of patient samples diagnosed using a reference assay test panel. Our analysis focused on evaluating von Willebrand factor (VWF) multimers of high molecular weight multimers, intermediate molecular weight multimers (IMWM) and low molecular weight multimers (LMWM). Electrophoretic migration was performed with Hydrasys 2 scan and assessment was carried out through densitometric scanning using Phoresis software.

Results: Our study successfully reproduced all expected multimer patterns based on the VWD type previously determined. Analysis clearly demonstrated that heart failure patients with mechanical circulatory support had high plasma VWF levels making the migration not discriminant with the methodology proposed by fabricant. Thus, diluting the plasma samples to a level of 100%, taking into account the plasmatic concentration of the VWF, allowed improving the accuracy of the test. We also propose as a standardized healthy control the CryocheckTM plasma along with reference values.

Conclusion: All in all, this standardized semi-automated multimer analysis system effectively reveals VWF multimer profile. Adaptation and reproducibility analysis of this test realized in the present study will allow its use as an additional valuable laboratory tool for improving the diagnosis of VWD.

Keywords: Von Willebrand Factor, von Willebrand factor multimers, electrophoresis, Mechanical Circulatory Device, Acquired Von Willebrand Syndrome.

Introduction

La maladie de Willebrand (VWD) est la pathologie hémorragique héréditaire la plus fréquente, avec une incidence rapportée de 0,001% à 0,01% dans la population mondiale [1]. Cette pathologie est liée à un déficit en facteur von Willebrand (VWF), glycoprotéine possédant un rôle majeur dans l'hémostase primaire et dans la coagulation. Le VWF est synthétisé sous forme multimérique par les cellules endothéliales et les mégacaryocytes dans la moelle. Le VWF est ensuite stocké dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales et dans les granules α des mégacaryocytes et des plaquettes en attente d'être sécrété, respectivement, dans la matrice sous-endothéliale et dans le plasma [1]. Ces multimères peuvent atteindre 20000 Kilo-Dalton (kDA) et leur taille influence leur capacité de liaison aux plaquettes activées via leur domaine C1 et le domaine A1 dans le cas de VWF lié au sous-endothélium. Un autre rôle du VWF circulant est son interaction avec le facteur VIII (FVIII) qui est indispensable pour assurer la stabilité de ce dernier.

Il existe des formes acquises de VWD [2, 3] dites syndrome de Willebrand acquis (AVWS). Ces AVWS sont des troubles hémorragiques rares. Les manifestations cliniques et biologiques peuvent être similaires à certaines formes de VWD type 2 qualitatives [3]. Ce syndrome peut apparaître dans le cas d'une maladie auto-immune, dans le cas d'hémopathies ou de cancers solides. Il apparaît aussi au cours de certains traitements médicamenteux. Les AVWS sont des maladies rares mais de prévalence probablement sous-estimée actuellement. Au cours des dernières années, de nombreux AVWS ont été décrits dans les maladies cardiovasculaires lors de l'altération des forces de cisaillements du sang, notamment lors de sténose aortique ou chez des patients implantés avec une assistance mécanique du ventricule gauche à flux continue [3] ou une ECMO (extracorporeal membrane oxygenation). Ces pathologies cardiovasculaires ou ces systèmes d'assistances circulatoires associés à des forces de cisaillement élevées entraînent des modifications du profil multimérique du VWF qui ont été proposés comme des outils biologiques pour évaluer les anomalies du flux sanguin et surtout le risque hémorragique. En effet, ces AVWS entraînent une diminution des multimères les plus actifs du VWF,

ceux de haut et très haut poids moléculaire, qui peuvent être à l'origine de saignements. Devant le nombre croissant d'implantation de dispositifs d'assistance circulatoire, la quantification des multimères de VWF, notamment ceux de haut poids moléculaire, pourrait se révéler extrêmement utile dans les centres suivant ces patients cardiovasculaires. Une technique semi-automatisée a été récemment commercialisée par la société Sébia (HYDRAGEL 5/11 VON WILLEBRAND MULTIMERS) et pourrait permettre d'analyser et rendre en routine clinique les profils de multimères du VWF dans un temps acceptable pour son utilisation clinique.

Ainsi, l'objectif de ce travail est d'évaluer les performances de cette nouvelle technique et son intérêt pratique pour l'analyse des multimères de VWF dans les situations cardiovasculaires.

Matériels et méthodes

Étude des multimères de VWF

Les multimères de VWF ont été analysés avec l'Hydrasys 2 scan (PN1200, Sébia, Lisses, France) selon la méthode préconisée par le fournisseur et précédemment publiée. Il s'agit d'un instrument programmable d'analyse de gel d'agarose. Il permet une migration par électrophorèse semi-automatisée, une immunofixation, une révélation directement sur le gel et une densitométrie. L'analyse a été réalisée à l'aide de Hydragel 11 von Willebrand Multimers kit (PN4360, Sébia) : il s'agit d'un kit contenant dix gels d'agarose 2% prêts à l'emploi contenant chacun 11 puits, ces derniers sont des gels de faible résolution et ne permettent pas de différencier plusieurs éléments : (1) ils ne permettent pas de différencier les multimères de très haut poids moléculaire de ceux de haut poids moléculaire ; (2) ils ne permettent pas d'observer les bandes satellites des multimères du VWF, qui proviennent de la protéolyse de VWF, générant des bandes satellites de quelques dalton de différences avec la bande centrale. Les échantillons de plasmas de VWD constitutionnelles testés ont été dilués tout d'abord selon les recommandations du fournisseur, à savoir $1/6^{\text{ième}}$ pour les plasmas ayant un taux de VWF antigène (VWF:Ag) inférieur à 150%, $1/20^{\text{ième}}$ pour les plasmas à taux de VWF supérieur ou égal à 150%. Une dilution permettant de ramener le taux antigénique de VWF (VWF:Ag) à 100% a été ensuite évaluée. Les plasmas dilués ont été placés au bain marie pendant 20 minutes à 45°C, puis ramenés à température ambiante pendant que le gel est fixé sur le plateau de migration de l'Hydrasys 2 scan pendant 5 minutes avec les mèches de tampons salins accrochées au chariot. 5µL de plasma dilué sont ensuite déposés sur les puits du gel et mis à migrer pendant 100 minutes environ. La révélation s'effectue avec le 11 von Willebrand Multimers Visualisation kit. Il contient une solution de dilution antisérum, une solution d'anticorps anti-VWF, une solution d'anticorps anti-IgG-péroxydase, un solvant TTF1/TTF2, et deux flacons de TTF1 et 2 flacons de TTF2. Une incubation d'une heure avec l'antisérum anticorps anti-VWF est réalisée puis le gel est lavé avant incubation avec l'anticorps secondaire anti-IgG couplé à la peroxydase pendant 30 minutes. Enfin la solution de

révélation avec du TTF est déposée sur le gel pendant 10 minutes. Le gel est ensuite mis à sécher puis à laver avant d'être lu et interprété par densitométrie avec le logiciel. Notre analyse s'est concentrée sur l'évaluation de la quantification des multimères de VWF de haut poids moléculaire (HMWM), de poids intermédiaire (IMWM), et de faible poids (LMWM) et les comparant avec le contrôle en faisant le rapport $\frac{\text{Multimères VWF patient}}{\text{Mutimères VWF control}}$.

Plasmas testés

Les échantillons de plasma utilisés dans cette étude ont été obtenus par double centrifugation de prélèvements sanguins prélevés sur tubes citratés, de patients atteints de VWD bien caractérisé et provenant du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Lariboisière (AP-HP, Paris, France) et de donneurs sains (pool de plasmas, HEGP, EFS convention CPSL UNT N 12/EFS/064, Paris, France). Le pool de plasmas a été obtenu à partir de 30 volontaires sains, âgés entre 25 et 45 ans composé de 66% de femmes en 200X ?. Les critères d'exclusion étaient : l'absence de syndrome grippal, de maladie infectieuse ou inflammatoire chronique, la prise d'un traitement hormonal (contraceptif oestroprogestatif) ou d'anti inflammatoire non stéroïdiens. Le groupe sanguin du patient n'était pas un critère d'exclusion. Étaient exclus les plasmas de volontaires sains pour lesquels un dosage de VWF:Ag (STA-LIATEST VWF:Ag, ref 00518 et automate STAR évolution, Stago, Asnières-sur-Seine, France) était supérieur à 140% dans le but d'obtenir un pool de plasma avec un taux de VWF:Ag aux alentours de 100%. Les plasmas retenus ont ensuite été poolés et le VWF: Ag a été dosé, obtenant le taux de 111% d'VWF:Ag. Le plasma obtenu a été aliquoté en fractions de 100µL et conservé dans un congélateur à < -70°C, et a servi de contrôle interne pour cette étude.

Les plasmas lyophilisés sont des plasmas de contrôle de qualité normal (CQN) et pathologique (CQP) commercialisés par HYPHEN Biomed (Neuville sur Oise, France).

Les plasmas congelés standards sont des plasmas Cryocheck™ commercialisés par Cryopep (CCN-10, Montpellier, France). Les patients implantés avec une assistance ventriculaire gauche ont été

explorés dans le cadre d'un bilan d'hémostase pour exploration d'un syndrome hémorragique ou d'une anémie survenant pendant implantation.

Analyses des performances.

Afin de standardiser la technique, plusieurs analyses de répétabilité et de reproductibilité de multimères VWF avec le pool de plasma et les plasmas tests congelés ont été réalisées. Pour le pool de plasma des tests de répétabilité et de reproductibilité ont été réalisés en faisant varier les lots de gels, de réactifs et les opérateurs. De même pour les plasmas testés, ces tests de performances ont aussi été réalisés afin d'établir des écart types (ET), coefficients de variation (CV) et seuil d'acceptabilité. Nous avons ensuite effectué des analyses statistiques Mann et Whitney où nous considérons la valeur P comme statistiquement significative pour $p < 0,05$.

Résultats

Validation de la méthode dans la maladie de Willebrand constitutionnelle

L'efficacité du gel à discriminer les différents types et sous type de VWD constitutionnelle a été évaluée (**Tableau 1 et Figure 1**). La migration a tout d'abord été faite selon la dilution recommandée par le fournisseur, c'est-à-dire une dilution au 1/6^{ème}. Nous avons fait migrer sur les différentes pistes respectivement un patient atteint de VWD de type 1, un patient VWD de type 1 dit Clairance de Vincenza, un patient VWD de type 2A, un patient VWD de type 2A (IIE), un patient VWD de type 2B, un patient de VWD type 2M, un patient de type VWD 2M/2A like, un patient de VWD type 2N, un patient atteint VWD de type 3 et enfin un patient avec AVWS. Pour les VWD de type 1 liées à un défaut de synthèse/sécrétion de VWF, nous retrouvons bien une diminution de la concentration de VWF dans le plasma. Son profil de migration observé en densitométrie reste similaire à notre contrôle sain (HMWM : 37,4%, ratio HMWM patient/contrôle 1,22). L'analyse du profil de migration des VWF de type 1 clairance de Vincenza sur la piste 2 n'est pas interprétable en l'état, sa faible densité optique rend l'analyse impossible du fait de la faible concentration de VWF plasmatique (< 15%). Sur la piste 3, le plasma correspond à un patient VWD de type 2A, on observe chez ce patient une perte des VWF de IMWM et de HMWM de VWF (Tableau 1, ratio IMWM : 0,26 ; ratio HMWM : 0,23) comme attendu, ce sous-type ayant une perte de multimères à cause d'un défaut d'assemblage. La piste 4 correspond à un patient VWD de type 2A (IIE), qui se caractérise par la perte de bandes satellites des multimères de VWF. Le profil densitométrique ne révèle pas de perte des multimères par rapport à notre contrôle (LMWM ratio : 1,23 ; IMWM ratio : 0,92 ; HMWM ratio : 0,82). Ainsi le gel d'agarose ne permet pas d'observer les bandes microsattellites des multimères de VWF. Sur la piste 5, le plasma correspond à un patient VWD de type 2B caractérisé par une perte prononcée des HMWM qui est observable sur le profil densitométrique (ratio HMWM : 0,12) mais aussi des

multimères VWF IMWM (IMWM ratio : 0,60). Sur la piste 6, le plasma correspond à un patient VWD de type 2M, il peut avoir une perte des VWF de HMWM comme dans le cas présenté (HMWM ratio : 0,66), en revanche, ce sous-type se caractérise par son incapacité à lier le domaine GPIb des plaquettes. Sur la piste 7, le plasma correspond à un patient VWD de type 2M-2A like, avec une perte de fonction du VWF, ici les VWF HMWM sont faiblement diminués (ratio HMWM 0,71). Sur la piste 8, le plasma correspond à un patient VWD de type 2N qui se caractérise par la perte de liaison au facteur FVIII tout en conservant sa capacité à lier les plaquettes, son profil densitométrique est similaire au pool contrôle. Sur la piste 9, le plasma correspond à un patient VWD de type 3 et comme attendu son profil densitométrique ne permet pas d'interpréter son profil en raison du taux très bas de VWF:Ag. Sur la piste 10, le plasma correspond à un patient VWD avec un AVWS qui présente une perte totale de VWF et de leur fonction.

Validation de la méthode avec des taux de VWF élevés.

Les patients sous assistance circulatoire mécanique HeartMate (HM-II ou -III) présentent souvent des taux élevés de VWF:Ag associés à une perte de HMWM. Nous avons donc choisi ces patients pour mettre au point la technologie en cas de recherche de AVWS malgré des taux de VWF:Ag élevés. En cas de prélèvement avec un taux de VWF:Ag élevé (>150%), le fournisseur propose une dilution au 1/20^{ème}. Toutefois, la réalisation du test suivant ces recommandations entraîne des profils difficilement interprétables et reproductibles (**Figure 2A**). Ainsi nous avons choisi de réaliser un dépôt ajusté à un taux de VWF:Ag à 100% comme précédemment décrit dans la littérature [4]. La **figure 2A** montre un gel avec les 3 dilutions différentes pour un plasma de patient avec un taux élevé de VWF (VWF:Ag = 555%), [5, 6] . Dans les pistes 1-3 le plasma est dilué au 1/6^{ème}, au 1/20^{ème} pour les pistes 4-6 ont leur plasma dilué et ramené à 100% pour les pistes 7-10. Pour des plasmas avec un taux de VWF:Ag élevé au-dessus de 150%, nous choisirons donc de rester sur des dépôts de

plasma avec un ajustement du taux de VWF:Ag ajusté à 100%. Sur la **figure 2B**, les plasmas utilisés sont issus de patients implantés avec une assistance circulatoire de type HM-II qui ont été dilués de sorte à ajuster le taux de VWF : Ag à 100%. Comme cité dans la littérature [2, 3], nous retrouvons bien une diminution significative des HMWM chez les patients implantés avec un HMII par rapport à un pool de plasma normal (**Figure 2C**) mais également une augmentation significative des LMWM chez ces patients implantés avec un HM-II. Les résultats présentés sur la **figure 2C** correspondent à 33 échantillons de plasma de patients implantés avec HM-II et 206 échantillons du pool de plasma normal.

Test de répétabilité, reproductibilité du pool de plasma et recherche d'un contrôle sain standardisé pour exploration des patients sous assistances circulatoires

La répétabilité et l'évaluation de la variabilité intra-gel et inter-gel pour le pool de plasma « maison » sont présentées dans le **Tableau 2**. Les répétabilités ont été réalisées sur deux lots de gels différents. Les CV obtenus, inférieurs à 10 % pour les différents poids moléculaires de multimères de VWF, (LMWM lot 1 : 7,88 %, lot 2 : 9,10 % ; IMWM lot 1 : 6,48 %, lot 2 : 6,87 % ; HMWM lot 1 : 9,23 %, lot 2 : 9,31 %), correspondant à une homogénéité de la distribution des valeurs obtenues par cette analyse. Nous avons ensuite testé la reproductibilité des gels en passant sur différents lots de gel, une à plusieurs fois notre pool de plasma (n=206). Nous obtenons des valeurs normalisées suivantes pour le pool : LMWM : 37,94±3,64%, IMWM : 34,76±2,45%, HMWM : 27,42±3,03%. Nous avons également calculé le pourcentage de biais des différents opérateurs par rapport au référent (**Tableau 3**). Nous pouvons observer que l'opérateur 1 a en moyenne un biais de 11,1% pour les VWF LMWM par rapport à la moyenne du référent. Pour les autres catégories de taille de VWF, tous les opérateurs ont un biais par rapport au référent inférieur à 10%. Ces résultats ont permis d'établir le pool de plasma comme un contrôle fiable pour la mise au point de la technique, néanmoins pour atteindre le

niveau requis pour l'accréditation d'un test, nous avons besoin d'un plasma standardisé. Ainsi, dans l'objectif d'accréditation de la technique (délivrée par le Comité français d'accréditation (COFRAC) et reposant sur des normes européennes harmonisées NF EN ISO 15189 pour les laboratoires de biologie médicale, des plasmas lyophilisés et des plasmas congelés standards ont été comparés à notre pool de plasma maison. Nous avons comparé différents contrôles standardisés utilisés en laboratoire (**Figure 3**). Nous observons des valeurs plus faibles pour les plasmas lyophilisés reconstitués (CQN : HMWM $19,2 \pm 0,85$; CQP : HMWM $23,3 \pm 0,42$) avec les VWF HMWM du plasma CQN inférieur au plasma au VWF HMWM du plasma CQP (**Tableau 4**). Nous avons également réalisé des tests de répétabilité et de reproductibilité avec le plasma congelé Cryocheck™ (**Tableau 5**). Ces tests ont été fait sur plusieurs lots de gel Sébia. Les CV des pistes correspondant aux différents poids moléculaires de VWF et sont inférieurs à 15%, et ce quel que soit l'opérateur ou le lot utilisé. Le test de reproductibilité montre des CV inférieurs à 15% : LMWM 8,4 % ; IMWM 5,9 % ; HMWM 12,0 %. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour le pool de plasma maison (**Tableau 2**). Les valeurs normalisées pour le pool de plasma Cryocheck™ sont obtenues par la moyenne ± 3 ET, à savoir LMWM $40,0 \pm 10,1$; IMWM $35,2 \pm 6,2$; HMWM $24,8 \pm 8,9$. Le **Tableau 6** montre le pourcentage de biais entre trois opérateurs : le référent de la technique ainsi que 2 opérateurs. Pour les LMWM, par rapport au référent, on observe une différence de 11,1 % pour l'opérateur 2 et de 3,1 % pour l'opérateur 1. Pour IMWM, les pourcentages de différence par rapport au référent sont de 9,4 % pour l'opérateur 1 et de 4,5 % pour l'opérateur 2. En ce qui concerne HMWM, les pourcentages de différence par rapport au référent sont de 1,6 % pour l'opérateur 1 et de 1,6 % pour l'opérateur 2.

Discussion

L'évaluation des multimères de VWF peut être utile dans les VWD constitutionnelles principalement pour différencier la VWD de type 2A et 2B de la VWD de type 2M (ou de type 1), car la classification correcte entraîne des prises en charge thérapeutiques différentes. Malheureusement, jusqu'à présent, l'analyse des multimères de VWF n'est été réalisé que par un nombre limité de laboratoires experts ou de référence en raison de la complexité et la durée de la technique d'analyse, de sa nature laborieuse, ainsi que de l'absence de normalisation. Les principales méthodes utilisées en clinique pour la visualisation des multimères de VWF restent des méthodes d'électrophorèse généralement sur des gels d'agarose avec différentes options pour la visualisation immunologique des multimères (méthodes radioactives notamment). Les techniques radioactives sont de moins en moins utilisées car nécessitent un équipement complexe, mais les méthodes non radioactives conventionnelles manquent de sensibilité et de résolution optimale, ce qui peut conduire à des erreurs diagnostiques. De plus, un autre inconvénient des méthodes d'électrophorèse développées en interne est la difficulté à réaliser une analyse réellement quantitative des multimères de VWF. Ainsi, la classification actuelle de la VWD ne tient pas compte de la quantité de perte des multimères de poids moléculaire élevé (HMWM) [7]. La méthode Sebia fournit des résultats quantitatifs des multimères de VWF et permet, si nécessaire, de diviser les courbes en sous-ensembles de multimères. Les laboratoires peuvent être en mesure d'établir des intervalles de référence normaux pour différentes tailles de multimères (LMWM, IMWM et HMWM) et de quantifier le pourcentage de perte. Les performances quantitatives du test des multimères de VWF de Sebia (intervalles de référence, limites de décision clinique) n'ont fait l'objet que de très peu d'études et aucune valeur normale utilisable en clinique n'est à ce jour mise en place.

Ainsi, nous avons voulu valider cette méthode dans notre laboratoire d'hémostase afin de pouvoir le proposer en analyse de routine notamment dans le cadre des AVWS après implantation d'assistances

circulatoires ventriculaire gauche. La dilution recommandée par le fournisseur est suffisante pour les cas de patients atteints de VWD constitutionnelle avec des taux de VWF :Ag inférieurs à 150%, mais lorsque ces derniers ont des taux de VWF:Ag supérieurs, il devient nécessaire de diluer leur plasma en ramenant le taux de VWF:Ag à 100% plutôt que de diluer au 1/20 comme indiqué par le fournisseur pour obtenir des résultats précis sans risque de générer des pistes avec des bandes trop épaisses qui pourraient se superposer et lisser leur courbe d'intégration, ce qui nuit à l'analyse et à l'interprétation des résultats. Ainsi, pour les taux inférieurs à 100%, nous avons choisi de garder la dilution au 1/6^{ième} et avons standardisé le dépôt à une normalisation à 100% de VWF:Ag pour les taux de VWF supérieurs à 100%.

Au niveau des contrôles internes utilisés, nous avons testés un pool de plasma de volontaires sains dit « maison » ainsi que des plasmas du commerce : un pool de plasma congelé Cryocheck™ fourni par la société Cryopep ainsi que des plasmas lyophilisés utilisés (CQN et CQP) en routine clinique. Nous avons rapidement abandonné l'utilisation des plasmas lyophilisés car les taux de multimères quel que soit leurs poids moléculaires sont significativement diminués par rapports aux pools de plasma dit « maison » ou au plasma congelé Cryocheck™. La répétabilité de ces deux types de plasma a montré des CV très faibles, inférieurs à 15%, en particulier pour les CV des LMWM et des HMWM, qui présentent une forte dispersion de leur pourcentage avec des ET plus élevés que les IMWM, conduisant à des CV plus bas.

Enfin, en combinant toutes les analyses faites dans le test inter gel, en changeant les opérateurs, ceux qui se forment à la technique en étant supervisés et d'autres capables de la réaliser sans supervision, nous obtenons des CV également inférieurs à 15%, en se comparant avec l'équipe de Pikta et al [5, 8] nous observons les mêmes tendances que ces derniers, un CV plus fort pour les LMWM et les HMWM : 16,6% pour les LMWM, 6,2% pour les IMWM, et 8,1% pour les HMWM dans l'équipe de Pikta, et notre équipe : 9,61 % pour les LMWM ; 7,05 % pour les IMWM et 11,05 % pour les

HMWM. Les CV pour le plasma congelé Cryocheck™ dans le test de reproductibilité intergel ont la même tendance de ceux du pool de plasma maison à savoir : 8,4% pour les LMWM ; 5,2% pour les IMWM ; 12,0 % pour les HMWM. Cela nous conforte pour le futur remplacement de ce pool de plasma par le plasma Cryocheck™ en tant que plasma contrôle sain, dans l'optique de l'accréditation de la méthode.

La rapidité d'analyse, les gels et les profils obtenus avec les gels Sébia permettent d'obtenir des résultats conformes à ceux obtenus par la méthode historique [6]. Cependant il y a des limites à la généralisation de cette technique dans les laboratoires d'hémostase. La première est technique : cette technologie semi-automatisée ne permet malheureusement pas la visualisation des multimères de très haut poids moléculaire de VWF : au-dessus de 10 mers tous les multimères sont considérés de haut poids moléculaire sans distinction. En effet, la résolution ne permet pas de différencier les multimères de très hauts poids moléculaires des haut poids moléculaires, ce qui nous force à regrouper ces deux groupes en une seule catégorie, les HMWM. De plus cette résolution empêche également l'observation des bandes satellites des bandes des multimères de VWF, obtenus par l'action de la métalloprotéinase ADAMTS13 (a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin type 1 repeats, member 13), empêchant alors d'observer l'activité de la protéinase, empêchant ce fait de diagnostiquer d'une part les Willebrand de type 2A (IIE), mais aussi une autre maladie liée au déficit fonctionnel de cette métalloprotéinase, le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). La détection des multimères de VWF est aussi compliquée pour les patients ayant un taux inférieur à 15% de VWF: Ag quel que soit la dilution utilisée. La seconde limite est de savoir si l'évaluation et la quantification des multimères de VWF est nécessaire dans le panel de tests de VWD. En effet, les ratio d'activité cofacteur de la ristocétine (VWF:RCo) ou activité collagène binding (VWF:CB) sur le VWF:Ag peuvent être utilisés comme marqueurs substituts pour la perte des HMWM [9]. Nous avons récemment montré que VWF:CB était très fortement liée aux niveaux des HMWM chez des patients atteints de la COVID-19 [10]. Le VWF:CB étant très simple d'utilisation notamment sur

certaines automates récents (AcuStar instrument ; Werfen/Instrumentation Laboratory, Barcelone)[11], nous devons définir quel test est le plus pratique et utilisable pour l'évaluation des multimères de VWF en routine clinique. Cette activité du VWF de liaison au collagène est régulée par plusieurs facteurs, notamment la concentration plasmatique du VWF lui-même, ainsi que celle d'ADAMTS13, qui clive les multimères de VWF de haut poids moléculaire.

En conclusion, le test commercial d'analyse des multimères du VWF (Hydragel von Willebrand Multimers ; Sébia,) est une excellente alternative aux tests traditionnels réalisés, en particulier pour la détection des syndromes de Willebrand acquis des patients cardiovasculaires ayant des taux très élevés d'antigène Willebrand. La méthode Sébia, bien que fastidieuse, permet d'obtenir des résultats en une journée par un opérateur. La technique est plus facile à réaliser que la méthode historique et pourrait être mise en œuvre dans n'importe quel laboratoire de biologie clinique pour l'évaluation des maladies de Willebrand. Notre étude permet d'envisager l'accréditation d'un tel paramètre.

Références:

1. Leebeek, F. W. G., & Eikenboom, J. C. J. (2016). Von Willebrand's Disease. *The New England Journal of Medicine*, 375(21), 2067–2080.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1601561>
2. Ghariani, I., Braham, N., Veyradier, A., & Bekir, L. (2022). Acquired von Willebrand syndrome: Five cases report and literature review. *Thrombosis Research*, 218, 145–150.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.08.025>
3. Horiuchi, H., Doman, T., Kokame, K., Saiki, Y., & Matsumoto, M. (2019). Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 26(4), 303–314. <https://doi.org/10.5551/jat.RV17031>
4. Veyradier, A., Obert, B., Houllier, A., Meyer, D., & Girma, J.-P. (2001). Specific von Willebrand factor–cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood*, 98(6), 1765–1772. <https://doi.org/10.1182/blood.V98.6.1765>
5. Pikta, M., Zemtsovskaja, G., Bautista, H., Nouadje, G., Szanto, T., Viigimaa, M., & Banys, V. (2018). Preclinical evaluation of a semi-automated and rapid commercial electrophoresis assay for von Willebrand factor multimers. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(6). <https://doi.org/10.1002/jcla.22416>
6. Bowyer, A. (n.d.). Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydrigel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. <https://doi.org/DOI:10.1002/rth2.12141>
7. Centre de Référence de la Maladie de Willebrand. (2021, February). Protocole National de Diagnostic et de Soins (PNDS) Maladie de Willebrand.
8. Pikta, M., Szanto, T., Viigimaa, M., Lejniece, S., Balode, D., Saks, K., & Banys, V. (2021). Evaluation of a new semi-automated Hydrigel 11 von Willebrand factor multimers

assay kit for routine use. *Journal of Medical Biochemistry*, 40(2), 167–172.

<https://doi.org/10.5937/jomb0-26008>

9. Van Den Helm, S., Letunica, N., Barton, R., Weaver, A., Yaw, H. P., Karlaftis, V., ... Monagle, P. (2023). Changes in von Willebrand Factor Multimers, Concentration, and Function During Pediatric Extracorporeal Membrane Oxygenation*. *Pediatric Critical Care Medicine*, 24(4), 268. <https://doi.org/10.1097/PCC.0000000000003152>
10. Philippe, A., Gendron, N., Bory, O., Beauvais, A., Mirault, T., Planquette, B., ... Smadja, D. M. (2021). Von Willebrand factor collagen-binding capacity predicts in-hospital mortality in COVID-19 patients: insight from VWF/ADAMTS13 ratio imbalance. *Angiogenesis*, 24(3), 407–411. <https://doi.org/10.1007/s10456-021-09789-3>
11. Favaloro, E. J., Mohammed, S., Vong, R., & Pasalic, L. (2023). Laboratory Testing for von Willebrand Disease Using a Composite Rapid 3-Test Chemiluminescence-Based von Willebrand Factor Assay Panel. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2663, 647–667. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3175-1_43

Tableau 1 : Résultats des gels d'analyses de différents patients diagnostiqués avec une maladie de von Willebrand

VWD : Maladie de Willebrand (Von Willebrand Disease) ; VWF:Ag : Von Willebrand antigène
 LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ; AVWS : Syndrome von Willebrand acquis

Type de VWD	VWF: Ag (%)	LMWM (%)	LMWM RATIO	IMWM (%)	IMWM RATIO	HMWM (%)	HMWM RATIO
Type 1 sécrétion/synthèse	36	28,6	0,84	34,0	0,97	37,4	1,22
Type 1 clairance de Vincenza	11	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
Type 2A (IIA)	34	83,5	2,45	9,3	0,26	7,2	0,23
Type 2A (IIE)	42	41,9	1,23	32,3	0,92	25,8	0,84
Type 2B	58	75,2	2,21	21,1	0,60	3,7	0,12
Type 2M	64	58,0	1,70	21,7	0,62	20,3	0,66
Type 2M/2A like	22	46,1	1,35	32,1	0,91	21,8	0,71
Type 2N/3	49	32,1	0,94	30,7	0,87	37,2	1,21
Type 3	<5	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00
AVWS	11	0,0	0,00	0,0	0,00	0,0	0,00

Tableau 2 : Tableau de répétabilité et de reproductibilité intra- et inter-gel et inter-opérateur du pool de plasma :

VWF : facteur von Willebrand ; LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ; ET : Ecart type ; Min : Minimum ; Max : Maximum ; CV : Coefficient de variation

Pool	Répétabilité lot 1, 11-VWF n = 30			Répétabilité lot 2, 11-VWF n = 15			Reproductibilité intergel Pool n = 206			Volontaires sains n=20		
	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)
Moyenne	36,1	34,9	29,0	36,8	33,7	29,6	37,9	34,8	27,42	39,7	31,1	29,2
Médiane	35,8	35,0	29,0	35,9	33,7	30,1	37,5	34,8	27,40	39,6	31,1	28,9
ET	2,8	2,3	2,7	3,3	2,3	2,8	3,6	2,5	3,03	5,6	2,7	4,8
Limite acceptable basse 3x ET	27,5	28,1	21,0	26,7	26,7	21,3	27,0	27,4	18,3	22,9	23,1	15,0
Limite acceptable haute 3x ET	44,6	41,7	37,1	46,8	40,6	37,8	48,9	42,1	36,5	56,5	39,1	43,5
Limite acceptable basse 2x ET	30,4	30,4	23,7	30,1	29,0	24,1	30,6	29,9	21,4	28,5	25,8	19,7
Limite acceptable haute 2x ET	41,8	39,4	34,4	43,5	38,3	35,1	45,2	39,7	33,5	50,9	36,4	38,7
Min	31,2	27,4	24,1	31,2	27,4	24,1	29,5	27,4	20,5	30,1	25,9	19,4
Max	43,2	38,7	33,7	43,2	38,0	33,7	48,1	41,6	37,3	52,8	35,6	38,9
CV	7,88	6,48	9,23	9,10	6,87	9,31	9,61	7,0	11,1	14,10	8,55	16,27

Tableau 3 : Tableau de répétabilité et de reproductibilité intra- et inter-gel et inter-opérateur

du pool de plasma : Tableau de reproductibilité inter-opérateur

LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ;

	Piste 1	Piste 2	Piste 3	Piste 4
Référence	35,8	31,2	34,5	35,1
Opérateur 1	36,2	36,9	35,4	43,2
Opérateur 2	36,8	35,4	35,9	32,8
Biais LMWM Référence - Opérateur 1	-1,1	-18,3	-2,6	-23,1
Biais LMWM Référence - Opérateur 2	-2,8	-13,5	-4,1	6,6
Référence	33,1	38,0	35,0	34,8
Opérateur 1	34,4	35,0	30,9	27,4
Opérateur 2	32,8	33,2	35,1	33,5
Biais IMWM Référence - Opérateur 1	-3,9	7,9	11,7	21,3
Biais IMWM Référence - Opérateur 2	0,9	12,6	-0,3	3,7
Référence	31,1	30,8	30,5	30,1
Opérateur 1	29,4	28,1	33,7	29,4
Opérateur 2	30,4	31,4	29,0	33,7
Biais HMWM Référence - Opérateur 1	5,5	8,8	-10,5	2,3
Biais HMWM Référence - Opérateur 2	2,3	-1,9	4,9	-12,0

Tableau 4 : Évaluation des Multimères de facteur von Willebrand : Comparaison des différentes sources de plasma

Pool volontaires sains maison, Pool volontaires sains avec des plasmas commerciaux congelés (Cryocheck™) et des plasmas lyophilisés (Contrôle Qualité Normal, CQN et Contrôle Qualité Pathologique, CQP). ET : Ecart type ; LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ;

Plasmas	LMWM (%), Moyenne ±ET	IMWM (%), Moyenne ±ET	HMWM (%), Moyenne ±ET
Pool maison	38,6±2,98	32,8±2,11	28,6±0,87
Cryocheck™	41,0±1,87	33,8±2,62	25,2±2,16
CQN	48,3±0,49	32,2±0,35	19,2±0,85
CQP	40,1±2,76	36,7±2,33	23,3±0,42

Tableau 5 : Tableau de répétabilité et de reproductibilité du plasma contrôle standardisé Cryocheck™

LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ; ET : Ecart type ; Min : Minimum ; Max : Maximum ; CV : Coefficient de variation

Plasmas Cryocheck™	Répétabilité opérateur 1, N=9 Lot 1			Répétabilité opérateur 1, N=10 Lot 2			Répétabilité opérateur 2, N=10 Lot 2			Reproductibilité intergel, N = 41		
	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)
Moyenne	43,7	36,2	20,5	39,4	34,8	25,8	39,4	37,0	23,6	40,0	35,2	24,8
Médiane	44,8	35,7	19,2	39,7	34,4	26,0	38,7	37,3	23,4	41,1	35,3	24,4
ET	2,5	1,3	3,0	2,2	0,9	1,5	3,8	2,1	2,8	3,4	2,1	3,0
limite acceptable basse 3x ET	36,3	32,1	11,4	32,9	32,0	21,5	27,9	30,8	15,1	29,9	29,0	15,9
limite acceptable haute 3x ET	51,2	40,2	29,6	45,8	37,6	30,2	50,9	43,2	32,0	50,1	41,4	33,7
limite acceptable basse 2x ET	38,8	33,5	14,4	35,0	32,9	22,9	31,7	32,8	17,9	33,3	31,0	18,9
limite acceptable haute 2x ET	48,7	38,9	26,5	43,7	36,7	28,7	47,1	41,1	29,2	46,8	39,3	30,7
Min	38,2	34,9	17,6	36,2	33,9	23,2	33,6	32,6	20,0	33,6	30,9	17,6
Max	46,1	39,0	26,4	42,9	36,6	28,0	47,4	39,6	30,6	47,4	39,6	30,6
CV	5,7	3,7	14,8	5,5	2,7	5,7	9,7	5,6	12,0	8,4	5,9	12,0

Tableau 6 : Pourcentage de biais entre le référent et deux opérateurs formés à la technique

LMWM : Multimères de Bas poids moléculaires ; IMWM : Multimères de Moyen poids moléculaire ; HMWM : Multimères de Haut poids moléculaire ;

	LMWM (%)	IMWM (%)	HMWM (%)
Référence	34,2	35,2	30,6
Opérateur 1	37,9	31,9	30,2
Biais Référence - Opérateur 1	-11,1	9,4	1,6
Opérateur 2	35,2	33,7	31,1
Biais Référence - Opérateur 2	-3,1	4,5	-1,6

Figures

Figure 1 : Gel de multimères du facteur von Willebrand en fonction des différents types de déficits

Figure 1A : Gel hydrasis après révélation. Plasmas dilués selon recommandation du fournisseur. Les pistes sont 1 – 2 sont des maladies de Willebrand (VWD) de type 1 : 1, forme commune ; 2, Type 1 clairance de Vincenza. Les 3 – 8 sont des formes de maladies de Willebrand de type 2 : 3, Type 2A ; 4, Type 2A (IIE) ; 5, Type 2B ; 6, Type 2M ; 7, Type 2M-2A like ; 8, Type 2N. La piste 9 est une maladie de Willebrand de type 3 ; la piste 10 est une forme grave d'un syndrome de Willebrand acquis (AVWS). La piste 11 est notre pool de plasma.

Figure 1B : Profils densitométriques des pistes obtenus en A.

LMWM : Multimères de Bas poids moléculaires ; IMWM : Multimères de Moyen poids moléculaire ; HMWM : Multimères de Haut poids moléculaire

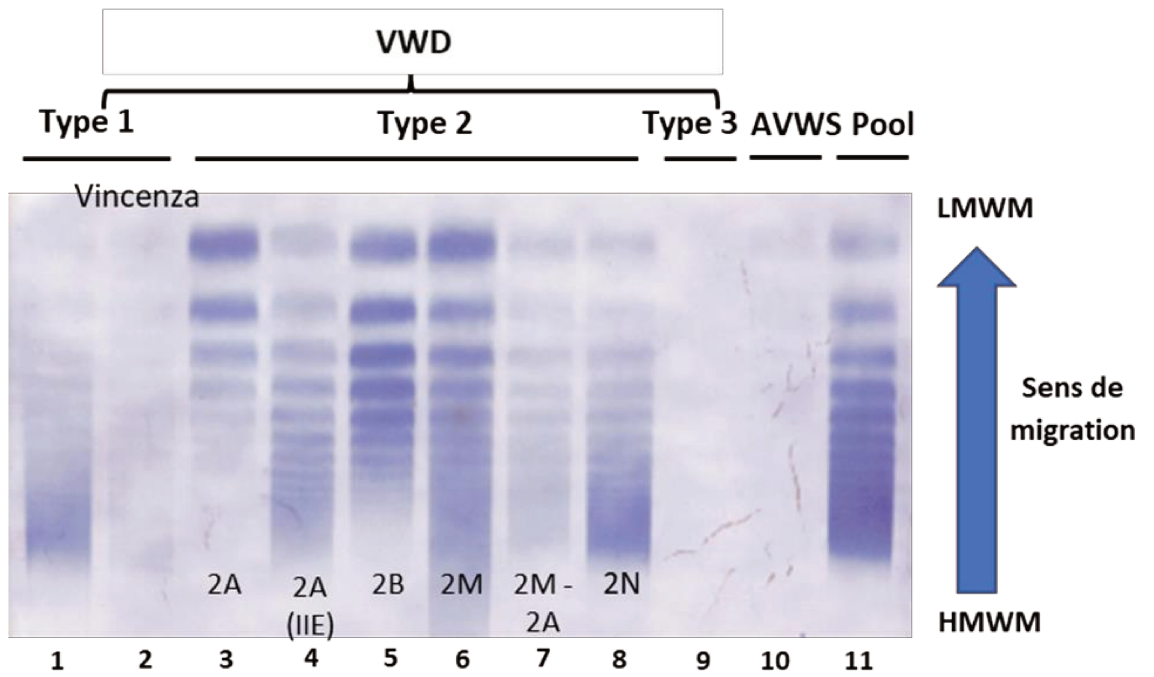
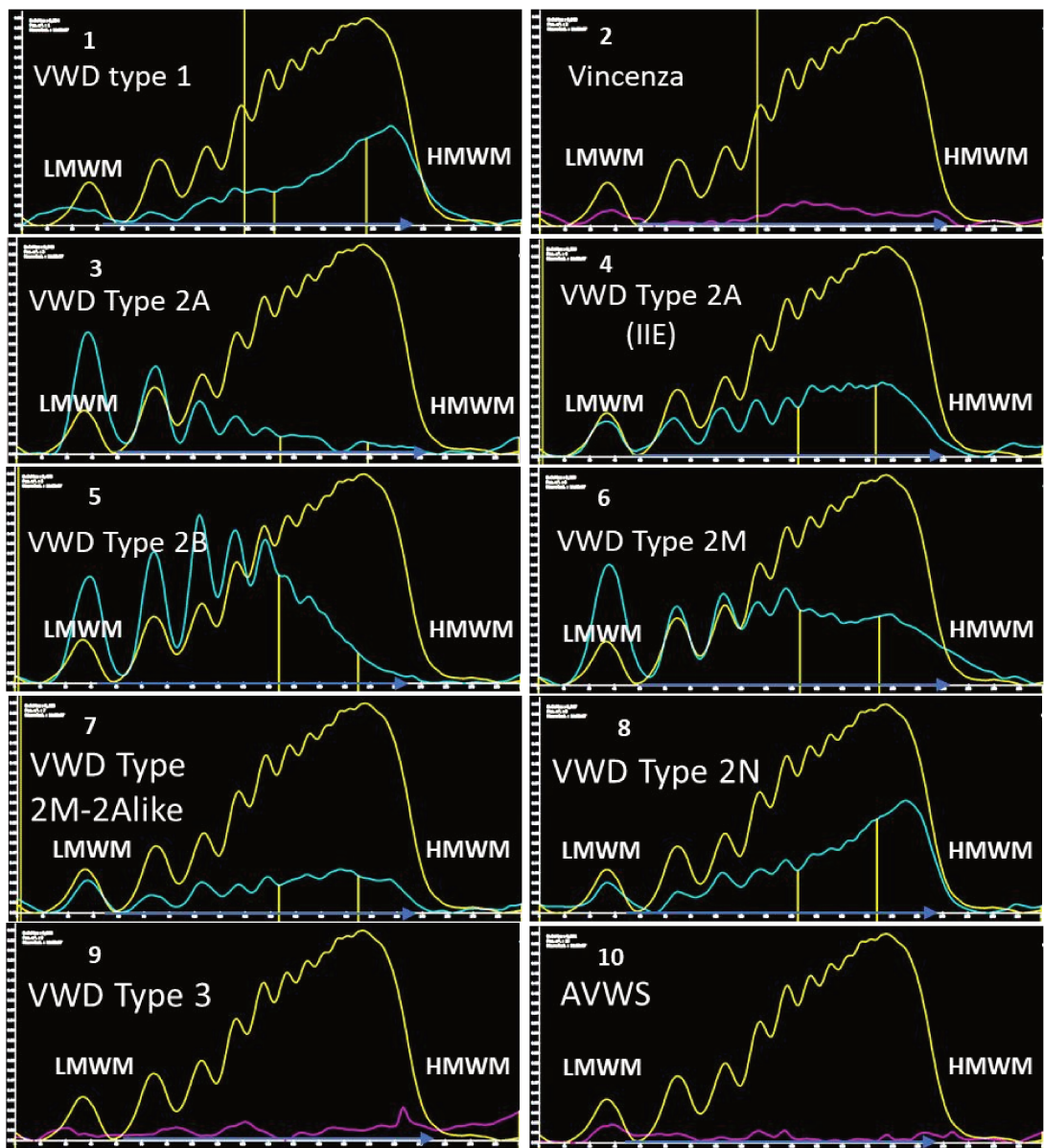
A**B**

Figure 2 : Évaluation des Multimères de facteur von Willebrand chez des patients implantés avec un Heartmate II.

A : Le plasma utilisé à un taux de VWF : Ag à 555%. Les pistes 1-3 le plasma a été dilué au 1/6, les pistes 4-6 correspond à une dilution 1/20 du plasma. Pour les pistes 7-10, le plasma a été dilué en fonction de son taux de VWF : Ag pour le ramené à 100%, dans ce cas, la dilution est au 1/33.

B : patients implantés sous assistance circulatoire HeartMate II

C : Analyse quantitative des VWF LMWM, IMWM et HMWM des patients HMII (en bleu) comparés à notre pool de plasma

VWF : facteur von Willebrand ; LMWM : Multimères de Bas poids moléculaires ; IMWM : Multimères de Moyen poids moléculaire ; HMWM : Multimères de Haut poids moléculaire

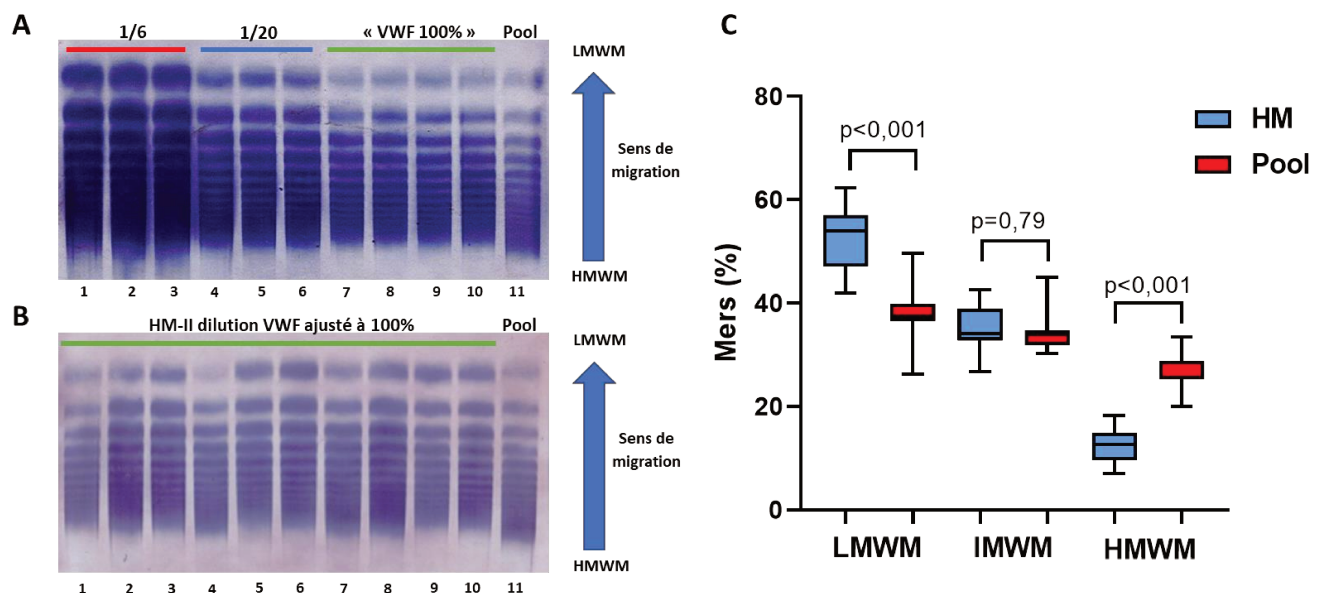
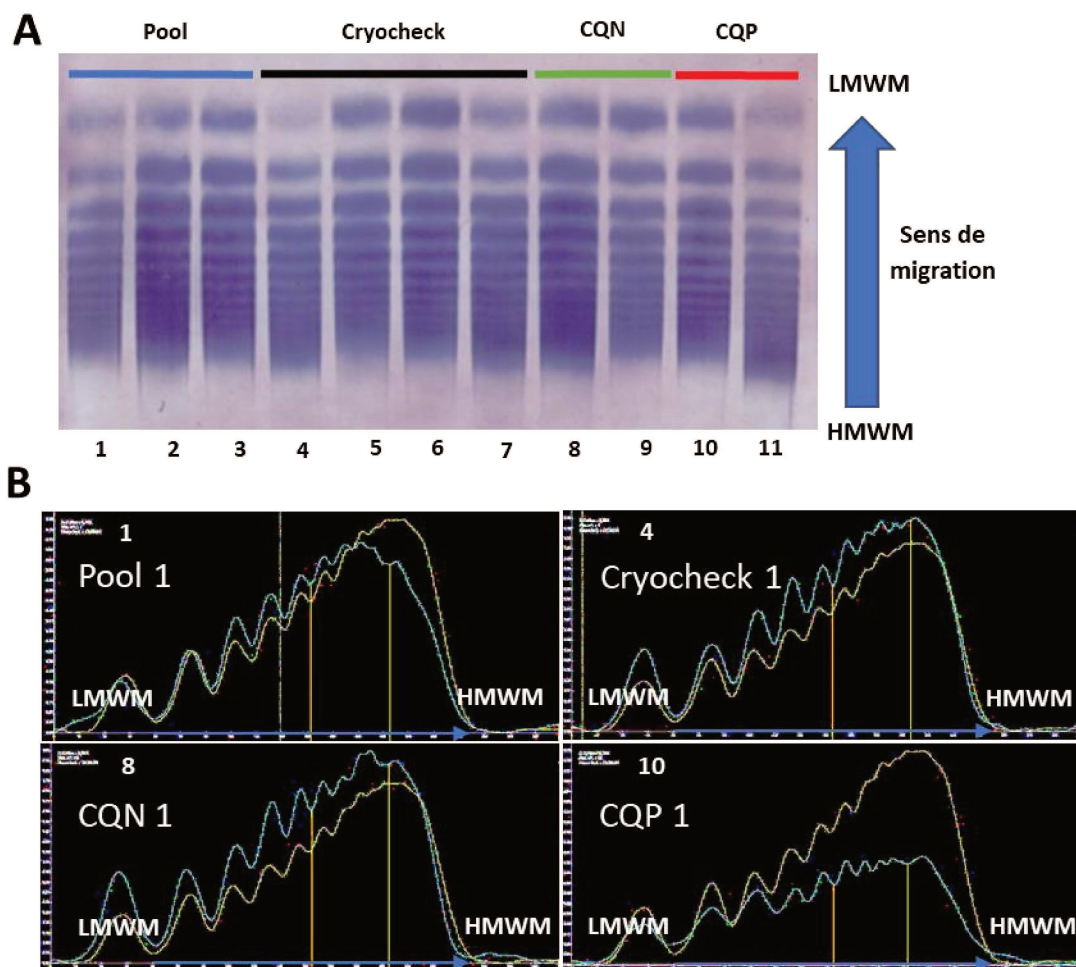


Figure 3 : Évaluation des Multimères de facteur von Willebrand : comparaison Pool volontaires sains avec des plasmas commerciaux congelés (Cryocheck™) et des plasmas lyophilisés

Figure 3A : Gel Hydrasis, pistes 1-3 plasma de pool, pistes 4-7 plasma Cryocheck™, pistes 8-9 plasma lyophilisé normal (Contrôle Qualité Normal, CQN) et piste 10-11 plasma lyophilisé pathologique (Contrôle Qualité Pathologique, CQP).

Figure 3B : 4 profils de migration des pistes du gel 3A (1-4-8-10), obtenus par densitométrie

LMWM : multimères de bas poids moléculaires ; IMWM : multimères de Poids moléculaires intermédiaires ; HMWM : multimères de Haut poids moléculaire ;



3.2. Bioprosthetic Total Artificial Heart in Autoregulated Mode Is Biologically Hemocompatible: Insights for Multimers of von Willebrand Factor

Le dispositif de cœur artificiel bioprothétique total Aeson (A-TAH) de Carmat fonctionne selon un flux pulsatile. L'objectif de cette étude est d'évaluer le potentiel hémolytique ainsi que son aptitude à modifier ou pas le profil multimérique du facteur von Willebrand suite à l'implantation d'un A-TAH.

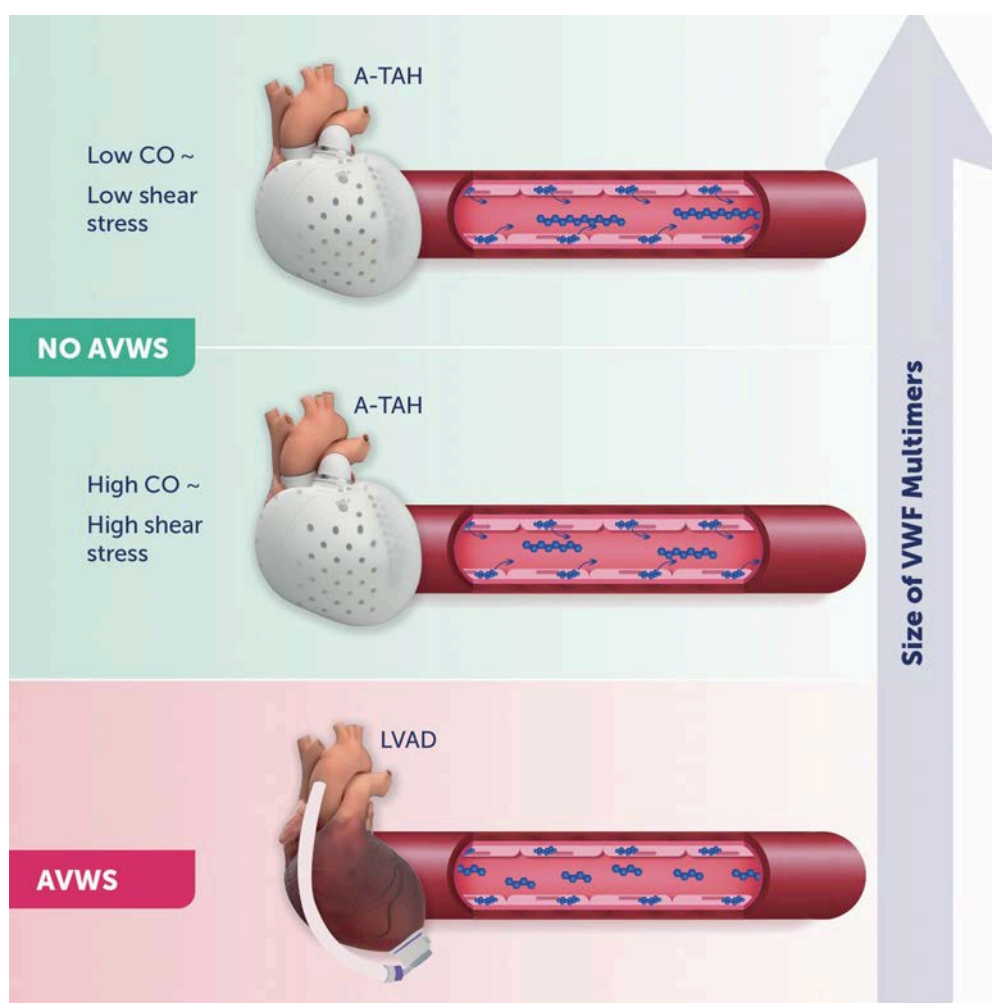
Nous avons examiné l'hémolyse et la présence du syndrome von Willebrand acquis chez des patients adultes porteurs d'un A-TAH (n=10) pendant leur suivi clinique, en les comparant à un groupe témoin et à des adultes ayant reçu une implantation de dispositifs HeartMate II ou HeartMate III. Dans le cadre de cette étude, nous avons développé un modèle d'interaction des fluides couplé à une simulation informatique de la dynamique des fluides dans l'A-TAH, afin d'évaluer les forces de cisaillement présentes dans la cavité du dispositif et leur répartition dans le volume sanguin.

La durée cumulative d'implantation de l'A-TAH a atteint 2087 jours. L'implantation de l'A-TAH n'a pas eu d'impact sur l'hémoglobine plasmatique pendant toute la période de soutien, et aucune corrélation n'a été observée entre l'hémoglobine plasmatique, le débit cardiaque ou le rythme cardiaque. En ce qui concerne l'évaluation du facteur von Willebrand, l'implantation de l'A-TAH n'a pas altéré le profil multimérique du facteur von Willebrand, contrairement à ce qui a été observé chez les patients ayant reçu des implants HeartMate II et HeartMate III. Alors même que les multimères notamment de haut poids moléculaire restent dans des valeurs normales, une corrélation a été trouvée entre les multimères de haut poids moléculaire et le débit cardiaque. Des analyses du modèle d'interaction des fluides et de la simulation informatique de la dynamique des fluides ont révélé une augmentation progressive des dommages aux protéines et aux cellules sanguines

en fonction de l'augmentation du débit cardiaque ($p < 0.01$). Cependant, la fraction du volume sanguin exposée à ces fortes forces de cisaillement était toujours inférieure à 0.03% du volume dans les deux ventricules, quelle que soit la variation du débit cardiaque.








Au cours de cette étude, nous avons démontré que l'A-TAH ne provoquait ni hémolyse ni syndrome de Willebrand acquis. Néanmoins, la relation entre les facteurs von Willebrand de haut poids moléculaire et le débit cardiaque dépendant du flux confirme l'importance du facteur von Willebrand en tant que reflet biologique de l'action du flux sanguin.

Résumé graphique:



TRANSLATIONAL SCIENCES

Bioprosthetic Total Artificial Heart in Autoregulated Mode Is Biologically Hemocompatible: Insights for Multimers of von Willebrand Factor

Bastien Poitier, Richard Chocron , Christophe Peronino, Aurélien Philippe, Yuri Pya, Nadia Rivet, Ulysse Richez, Mahabbat Bekbossynova , Nicolas Gendron , Marc Grimmé , Marie Cécile Bories, Julie Brichet, Antoine Capel, Jeanne Rancic, Benoit Vedie , Jean Christian Roussel , Anne-Sophie Jannot, Piet Jansen, Alain Carpentier, Peter Ivak, Christian Latremouille, Ivan Netuka, David M. Smadja 

BACKGROUND: Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson; A-TAH) is a pulsatile and autoregulated device. The aim of this study is to evaluate level of hemolysis potential acquired von Willebrand syndrome after A-TAH implantation.

METHODS: We examined the presence of hemolysis and acquired von Willebrand syndrome in adult patients receiving A-TAH support (n=10) during their whole clinical follow-up in comparison with control subjects and adult patients receiving Heartmate II or Heartmate III support. We also performed a fluid structure interaction model coupled with computational fluid dynamics simulation to evaluate the A-TAH resulting shear stress and its distribution in the blood volume.

RESULTS: The cumulative duration of A-TAH support was 2087 days. A-TAH implantation did not affect plasma free hemoglobin over time, and there was no association between plasma free hemoglobin and cardiac output or beat rate. For VWF (von Willebrand factor) evaluation, A-TAH implantation did not modify multimers profile of VWF in contrast to Heartmate II and Heartmate III. Furthermore, fluid structure interaction coupled with computational fluid dynamics showed a gradually increase of blood damage according to increase of cardiac output ($P < 0.01$), however, the blood volume fraction that endured significant shear stresses was always inferior to 0.03% of the volume for both ventricles in all regimens tested. An inverse association between cardiac output, beat rate, and high-molecular weight multimers ratio was found.

CONCLUSIONS: We demonstrated that A-TAH does not cause hemolysis or AWVS. However, relationship between HMWM and cardiac output depending flow confirms relevance of VWF as a biological sensor of blood flow, even in normal range.

GRAPHIC ABSTRACT: A [graphic abstract](#) is available for this article.

Key Words: blood volume ■ heart failure ■ heart transplantation ■ hemodynamics ■ plasma

Left ventricular assist devices (LVAD) and total artificial hearts (TAH) provide an alternative therapy to heart transplantation for selected patients with end-stage heart failure due to lack of donors and other transplant contraindications. Among them, the Heartmate II (HM-II), Heartware HVAD and most recently the Heartmate III (HM-III) are widely used. The rate of thrombosis is

See accompanying editorial on page 481

drastically reduced in patients implanted with centrifugal third generation LVADs (HM-III), but bleeding remains common at least in part related to hemodynamic perturbations and the contact of blood components with limited hemocompatibility biomaterials.¹ Acquired von Willebrand

Correspondence to: David M. Smadja, MD, PhD, Georges Pompidou European Hospital, Hematology Department, 20 rue Leblanc, 75015 Paris. Email david.smadja@aphp.fr

Supplemental Material is available at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.121.316833>.

For Sources of Funding and Disclosures, see page 479.

© 2022 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at www.ahajournals.org/journal/atvb

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

A-TAH	Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson)
AVWS	acquired von Willebrand syndrome
CFD	computational fluid dynamics
CO	cardiac output
FSI	fluid structure interaction
HM-II	Heartmate II
HM-III	Heartmate III
HMWM	high molecular-weight multimers
IMWM	intermediate molecular-weight multimers
INTERMACS	Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support class
LMWM	low molecular-weight multimers
LVAD	left ventricular assist devices
PFHb	plasma free hemoglobin
PI	pulsatility index
TAH	total artificial heart
VWF	von Willebrand factor
VWF:Ag	VWF antigen
VWF:Rco	VWF activity
VWFPp	VWF propeptide

syndrome (AVWS) and hemolysis are the primary trigger of thrombotic and bleeding complications. Hemolysis is defined as red blood cell destruction/breakdown, leading to hemoglobin release in blood plasma. AVWS is the result of a functional VWF (von Willebrand factor) impairment. VWF is a large multimeric glycoprotein secreted in blood flow from megakaryocytes, platelets, and vascular endothelial cells.² In response to vascular injury, vasoconstriction leads to a higher endothelial shear stress leading to VWF elongation. This high shear stress induced a conformation of circulating VWF able to bind efficiently to the exposed subendothelium, which then promotes platelet adhesion. Two major blood-flow related mechanisms of the AVWS can be observed in patients with an LVAD: first, an increased shear stress inducing VWF multimers breakdown and, second, a reduced pulsatile stretch causing a decreased VWF release from endothelial cells.^{3–5}

The Carmat bioprosthetic TAH (Aeson; A-TAH) is designed to be implanted in patients with biventricular end-stage heart failure and has 2 potentially desirable features: first, it is an autoregulated pulsatile device that accurately mimics cardiac physiology; second, its bioprosthetic surfaces in contact with blood exhibit a high degree of hemocompatibility. Indeed, the first version of the device has been used in a feasibility study^{6–8} in which the pump was managed in a manual mode with a cardiac output (CO) that could only be changed manually. In contrast, in the current European pivotal study, the A-TAH is endowed with an autoregulation feature (autoregulated mode)

Highlights

- Carmat bioprosthetic total artificial heart in autoregulated cardiac mode do not induce any hemolysis or acquired von willebrand syndrome in contrast to HM-II and HM-III.
- An inverse association between cardiac output, beat rate, cardiac index and high-molecular weight multimers ratio was found. This association has been confirmed in fluid structure interaction coupled with computational fluid dynamics demonstrating a gradually increase of blood damage according to increase of cardiac output.
- We explained absence of acquired von willebrand syndrome with modelisation models since blood volume fraction that endured significant shear stresses was always inferior to 0.03% of the volume for both ventricles in all regimens tested.
- Von willebrand factor WF is a good biological sensor of blood flow in cardiac assistance.

wherein the CO is modulated in real time depending on the venous return, mimicking normal cardiac function.^{9,10}

The study aims to evaluate hemocompatibility in the first 10 patients implanted with the last generation autoregulated A-TAH in the pivotal study through the measurement and correlation with hemodynamic parameters of biomarkers of hemolysis (plasma free hemoglobin [PFHb]) and VWF multimeric pattern.

MATERIALS AND METHODS

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Patients

Samples from the first 10 patients in the A-TAH CE Mark clinical trial (URL: <https://www.clinicaltrials.gov>; Unique identifier: NCT02962973) and patients implanted in the Georges Pompidou European Hospital with the HM-II and HM-III LVADs (from January 01, 2014 to December 31, 2020, authorization protocol number: 1922081) were included in this study (Table 1 and Table S1 for patient characteristics). The A-TAH is a biventricular prosthesis that provides pulsatile flow using an electrohydraulic pump. Its hemocompatibility is ensured on one hand by the pulsatility of the heart with physiological values of pressure and flow, and on the contrary by choice of materials in contact with blood. Each ventricle consists of two compartments (a blood compartment and a hydraulic fluid compartment) separated by a hybrid membrane. The membrane surface is made of processed bovine pericardial tissue on the blood-contacting side and a polyurethane layer at the hydraulic liquid contacting side. Two electrohydraulic rotary pumps generate systolic and diastolic phases by rapidly reversing the directional flow of silicon that, alternately, pushes and pulls the membranes. In the manual mode, physicians can set beat rate and stroke volume, determining the desired flow, which will remain

Table 1. Clinical Characteristics of Patients Included

Characteristics	A-TAH	HM-II	HM-III
Men, n (%)	10 (100.0)	11 (91.7)	16 (94.1)
Age at implant, y (±SD)	59.6±10.2	58±10.3	50.8±16.5
Body mass index, kg/m ² (±SD)	26.5±2.5	26.2±2.8	25.4±5.8
Comorbidities, n (%)			
Arterial hypertension	5 (50.0)	5 (41.7)	4 (23.5)
Diabetes	1 (10.0)	2 (16.7)	4 (23.5)
Dyslipidemia	5 (50.0)	6 (50.0)	5 (29.4)
Heart failure cause, n (%)			
Dilated	6 (60.0)	5 (41.7)	8 (47.1)
Ischemic	4 (40.0)	7 (58.3)	7 (41.2)
Other	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (11.8)
INTERMACS patient profile, n (%)			
1	0 (0.0)	1 (8.3)	5 (29.4)
2	1 (10.0)	1 (8.3)	2 (11.8)
3	8 (80.0)	7 (58.3)	5 (29.4)
4	1 (10.0)	2 (16.7)	3 (17.6)
5	0 (0.0)	1 (8.3)	2 (11.8)
Preoperative serum creatinine, μmol/L	112.8±50.1	143.3±53	102.5±50.7
Prior temporary mechanical circulatory support			
ECLS	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (23.5)
IABP	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.9)
Impella	0 (0.0)	1 (8.3)	0 (0.0)
Support duration, d (±SD)	165±103	785±613	397±269
Patients suffering from hemostatic complications, n (%)			
Thrombotic	0 (0.0)	3 (25)	1 (5.9)
Bleeding	1 (10)	8 (66.7)	8 (47.1)

A-TAH indicates carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson); ECLS, extracorporeal life support; HM, Heartmate; IABP, intra aortic balloon pump; and INTERMACS, Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support class.

constant. In the automatic mode, an algorithm adapts its outflow automatically in response to changes in preload and afterload by adjusting beat rate (35–150 beats per minute) while stroke volume remains constant.⁹ The resulting pulsatile blood flow ranges from 2 to 9 L/min,⁶ with automated adjustment on the left side to outbalance the bronchial circulation. Inputs to the autoregulated mode algorithm include left and right purge pressures, which represent the average of left and right ejection pressures over the systolic phase, and the right and left input pressures taken from the average over the diastolic pressures (RIP and LIP). CO is obtained by calculating the mean left ventricular flow. All these measurements are calculated from a rolling 10-minute mean. Patients of the feasibility study had been continuously supported by manual mode, whereas all patients of this study were promptly switched in automatic mode in the operating room. Regarding correlation with biological parameters, these hemodynamics measurements were daily average. Concerning potential hemostatic complications (thrombosis or bleeding) among the 10 patients on A-TAHs, no thrombotic complication has occurred while bleeding complication occurred only in one patient as presented in Tables S2 and S3 in contrast to HM-II and HM-III.

Samples and Analysis

The French blood bank institute provided venous blood from informed, healthy donors (agreement with Paris Descartes University, CCPSL UNT N 12/EFS/064). For A-TAH patients, blood samples were collected once a week during ICU, once a month during the first 6 months after implantation and every three months after 6 months. Blood samples were collected on sodium heparin for PFHb and 0.129 mol/L trisodium citrate tubes (9NC BD Vacutainer, Plymouth, United Kingdom) for VWF assay. PFHb (mg/L) was measured using spectrophotometry at specific wavelengths as previously described.⁸ For VWF analysis, laboratory assessments were done on platelet poor plasma isolated from citrate tubes. Platelet poor plasma were obtained after centrifugation twice at 2500g for 15 minutes. Platelet poor plasma was frozen and stored at −80°C until analysis. VWF antigen (VWF:Ag) and activity (VWF:Rco) used (STA Liatest, Diagnostica Stago) and a latex immunoturbidimetric assay (VWF:Rco; Diagnostica Stago), respectively, on a STA-R Max coagulometer (Diagnostica Stago). The number of samples analyzed for VWF in A-TAH group is unbalanced over time and for each patient. We provide the number in a Table S4. VWFpp (VWF propeptide) was measured with a commercially available ELISA kit (Senova; Cryopep Montpellier France).

VWF Multimers Analysis

The VWF multimers pattern was evaluated by a semi-automated assay: the Hydrigel 5 von Willebrand multimers kit, used with the Hydrasis 2 Scan instrumentation (Sebia, Lisses, France).^{11–14} All samples defrozed in a water bath at 37°C for 5 minutes were treated with the appropriate sample diluent and incubated for 20 minutes at 45°C. The dilution ratio was adapted to adjust all patients' samples to 100% VWF:Ag. The treated plasma samples were loaded onto Hydrigel 5 Von Willebrand multimers gels (5 μL/well) for migration by agarose gel electrophoresis. Direct immunofixation by anti-VWF antibody and visualization by peroxidase-labeled antibody revealed the multimeric profile. According to standard VWF multimers evaluation,¹⁵ the relative proportion of low- (≤5-mers, LMWM), intermediate- (6- to 10-mers, IMWM), and high-molecular-weight (>10-mers, HMWM) multimers of VWF was determined using densitometry analysis on Hydrasis 2 Scan. Multimers pattern curves were displayed with Sébia Phoresis software. For each patient, LMWM, IMWM, and HMWM were either expressed as a proportion of each patient's total multimers or as a ratio between patient's and healthy volunteers' pooled plasma.

Shear stress-induced AVWS is commonly defined by a pathological VWF:RCo/VWF:Ag ratio <0.6,¹⁶ or by loss of HMWM by comparison with plasma of a healthy subject analyzed in the same gel, resulting in a decreased HMWM ratio. Egger et al¹⁷ showed that there was a close correlation between the VWF:RCo/VWF:Ag ratio and HMWM loss.

Hemodynamic Simulation

To explore relationships between shear stress and potential AVWS and to simulate the interactions between shear stress and VWF, an fluid structure interaction (FSI) model coupled with computational fluid dynamics (CFD) simulations was developed^{18–20} as previously described. The FSI simulation well

describes the displacement and the stress of the solid parts. Coupling the FSI and the CFD simulations yielded the displacement of the solid parts (FSI) and an accurate blood flow description (CFD). Briefly, the geometric model was built from the computer conception aided design model of the A-TAH, except for the valves, which were simplified with only 3 leaflets by discarding the stent frame.

Statistical Analysis Method

For descriptive analysis, data were expressed as mean \pm SD and as frequencies and percent for continuous and categorical data, respectively. To evaluate changes over time, we performed linear mixed effect model separately for each biomarkers (PFHb, VWF:RCo/VWF:Ag ratio, LMWM, IMWM, HMWM) including the value of biomarkers as dependant variable, the period of time as explanatory variables and the patient as random effect. We tested the association between the levels of biomarkers and the level of hemodynamic parameters (CO and beat rate) using also linear mixed effect model separately for each biomarkers (PFHb, VWF:RCo/VWF:Ag ratio, HMWM ratio) including the value of hemodynamic parameters as dependant variable, the level of biomarkers as explanatory variables and the patient as random effect. The FSI simulations implemented in the CFD enabled us to extract graphs, showing for both ventricles the mean cumulative curves of shear stress distribution (Figure 2) presenting the mean blood volume concerned for each shear value ($n=10000$ for each shear value). We used the Simpson rules for the calculation of the area under the 3 mean cumulative curves (low, normal, and high CO). We compared the 3 mean cumulative curves using the Kolmogorov-Smirnov test. We analyzed the level of mean blood volume according to the 3 group of CO using repeated measures 1-way ANOVA. We performed the same analysis for the subgroups of patients that endured shear stresses above and below 17.5 Pa.

To assess how the type of assistance affect biomarkers over time, we used linear mixed effect model. In the model, time have been considered as categorical measure (<3 months, 3–6 months, and >6 months), the group variable (HM-II, HM-III, and A-TAH) as an independent variable, and we added a random effect for the patient and an interaction term between the type of assistance and the period of time. Finally, to check for assumptions, we used residual plots for each linear mixed-effects model.

All analyses were 2-sided, and a P value was considered statistically significant for $P<0.05$. Statistical analysis was performed using R studio software including R version 3.6.3 (Rstudio, Inc, Boston, MA).

RESULTS

Carmat Bioprosthetic TAH Implantation Does Not Induce Hemolysis

Between August 2016 and January 2019, 222 samples from patients implanted with A-TAH were collected. Cumulative duration of support was 1695 days. Ninety-eight point six percent (98.6%) of samples were under the INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support class) PFHb cut-off of 20 mg/dL throughout the follow-up. The 1.4% presenting PFHb increased were all isolated and spontaneously

corrected in 24 hours. The 2 remaining were isolated and spontaneously corrected, possibly reflecting a preanalytical problem more than actual hemolysis. Before implantation, PFHb was 4.64 mg/dL \pm 1.96 and remained steady after implantation (Table 2: 4.04 mg/dL \pm 4.67, 4.24 mg/dL \pm 3.78, and 4.03 mg/dL \pm 2.21, respectively, at <3 months, 3–6 months and >6 months; nonsignificant difference along time-period). Furthermore, there was no significant association between PFHb and CO, beat rate or cardiac index, using linear mixed regression model (Table 3, respectively, $P=0.343$, $P=0.293$, and $P=0.109$).

A-TAH Implantation Is Not Associated to AVWS

Two hundred and forty-three samples were collected from patients implanted with the A-TAH. We also included 29 patients implanted with a LVAD ($n=12$ for HM-II, and $n=17$ for HM-III) all with a biological follow-up after implantation. Moreover, 20 samples from healthy donors were compared with these patients with A-TAH and HM-II and HM-III. First, pooled normal plasma was included in all gels as a normal control for multimers profile. The interassay coefficient of variation, calculated using the normal quality control data from 169 gels, was 9.6% for LMWM, 7.6% for IMMW, and 11.2% for HMWM. Intra-assay variability was assessed with the normal quality control tested in 30 wells on 6 gels. Coefficient of variation was 10.9% for LMWM (mean 40.06% \pm 4.38), 7.0% for IMWM (mean 33.56% \pm 2.34), and 13.4% for HMWM (mean 26.15% \pm 3.50).

Concerning routine hemostasis evaluation during the follow-up after A-TAH implantation, we did not observed any significant differences for prothrombin time ratio and kaolin activated partial thromboplastine time (Table S5) while decreased over time was observed for fibrinogen in accordance to decrease of postoperative inflammation. In the same line, regarding VWF:Ag, we did observe an increase after implantation and a normalization after 3 months (Figure S1 and Table 2: 312.1% \pm 166.3 before implantation and 468.5% \pm 247.2, 289.0 \pm 101.4 and 281.7 % \pm 104.6, respectively, at <3 months, 3–6 months and >6 months after implantation; $P<0.001$, 0.174, and 0.405, respectively, at <3 months, 3–6 months, and >6 months). We did not observe any significant difference of VWF:RCo/VWF:Ag ratio and all subtypes of VWF multimers expressed in percentage or in ratio for A-TAH patients after implantation compared with healthy volunteers (respectively for VWF:RCo/VWF:Ag LMWM, IMWM and HMWM ratio; data not shown). In patients implanted with A-TAH, the HMWM ratio was 0.98 \pm 0.15 before implantation and remained steady over time after implantation (Table 2, 1.03 \pm 0.23, 1.01 \pm 0.14, and 0.96 \pm 0.13, respectively, at <3 months, 3–6 months, and >6 months; $P=0.261$, 0.139, and 0.373, respectively, at <3 months, 3–6 months, and >6 months). For patients with the longer follow-up, an individual variability according to the 3 periods of time post implantation demonstrate a stable level of HMWM during the follow-up (Figure S2).

Table 2. Plasma Free Hemoglobin and Von Willebrand Parameters Levels in the 10 Patients With A-TAH During the Follow-Up

Number of samples, n [min–max]	Before implantation		<3 mo		Month 3–month 6		>6 mo	
	1 [1–1]	Reference	20.6 [10–33]		2.7 [0–7]		1 [0–4]	
PFHb, mg/dL	4.64 (1.96)	Reference	4.04 (4.67)	−5.38 (−35.95 to 25.20, $P=0.365$)	4.24 (3.78)	−5.05 (−39.70 to 29.59, $P=0.387$)	4.03 (2.21)	−6.07 (−48.57 to 36.42, $P=0.390$)
VWF:Ag, %	312.1 (166.3)	Reference	468.5 (247.2)	147.34 (75.62 to 219.05, $P<0.001$)	289.0 (101.4)	−39.74 (−43.34 to 122.83, $P=0.174$)	281.7 (104.6)	−12.37 (−88.19 to 112.92, $P=0.405$)
VWF:Rco/VWF:Ag ratio	0.89 (0.13)	Reference	0.87 (0.11)	−0.02 (−0.08 to 0.04, $P=0.278$)	0.83 (0.13)	−0.04 (−0.12 to 0.03, $P=0.126$)	0.82 (0.16)	−0.04 (−0.13 to 0.04, $P=0.163$)
LMWM–ratio	1.11 (0.17)	Reference	1.11 (0.17)	0.01 (−0.08 to 0.09, $P=0.420$)	1.12 (0.15)	−0.03 (−0.13 to 0.06, $P=0.245$)	1.15 (0.14)	−0.01 (−0.12 to 0.11, $P=0.454$)
IMWM–ratio	0.92 (0.12)	Reference	0.88 (0.08)	−0.04 (−0.09 to 0.01, $P=0.051$)	0.88 (0.09)	−0.04 (−0.09 to 0.02, $P=0.104$)	0.88 (0.07)	−0.03 (−0.09 to 0.04, $P=0.212$)
HMWM–ratio	0.98 (0.15)	Reference	1.03 (0.23)	0.03 (−0.07 to 0.13, $P=0.261$)	1.01 (0.14)	0.06 (−0.05 to 0.18, $P=0.139$)	0.96 (0.13)	0.02 (−0.12 to 0.16, $P=0.373$)

A-TAH indicates Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson); HMWM, high-molecular weight multimers; IMWM, intermediate molecular weight multimers; LMWM, low-molecular weight multimers; PFHb, plasma free hemoglobin; VWF:Ag, VWF antigen; and VWF:Rco, VWF activity.

Values as mean (SD). The results of the linear regression model are expressed as estimate (95% CI; P value). Values before A-TAH implantation were used as reference in the model.

Likewise, the VWF:Rco/VWF:Ag ratio was 0.89 ± 0.13 before implantation and remained steady over time after implantation (0.87 ± 0.11 , 0.83 ± 0.13 , and 0.82 ± 0.16 , respectively, at <3 months, 3–6 months, and >6 months).

Levels of LMWM, IMWM, and HMWM ratio are shown in Figure 1. Thus, no AVWS was observed after A-TAH implantation in autoregulated mode in contrast to HM-II and HM-III regardless of the period following implantation. We finally explored and compared the postimplantation levels of VWF propeptide in patients transplanted with A-TAH (9 patients; 66 time points), HM-II (13 patients; 66 time points) and HM-III (17 patients; 67 time points). We observed that in patients implanted with the A-TAH that both VWF:Ag levels and propeptide levels are higher when compared with normal adults, leading to a normal VWF propeptide/VWF:Ag ratio (Figure 1F; between 0.6 and 1.6 as previously described²¹). Regarding implanted-patients with HM-II or HM-III, we also observed a normal VWF propeptide/VWF:Ag ratio as previously described after LVAD implantation.²²

Residual Pulse Pressure and VWF in HM-II and HM-III

We explored potential relation between residual pulse pressure (pulsatility index [PI]) and VWF degradation in

patients with HM-II and III, as demonstrated in Figure S3. We were able to obtain PI in 52 time points. We used the most common definition of high ($PI > 5.2$) and low PI ($PI < 4.6$) defined by Wever-Pinzon.²³ We found that higher PI was significantly associated with lower HMWM ratio ($P=0.018$). Therefore, higher residual pulsatility of native heart do not protect from VWF degradation.

Hemodynamic Simulation and Relation With VWF in A-TAH

To explore more deeply relationships between shear stress and potential AVWS, in particular with VWF, a FSI model coupled with CFD simulation was developed as previously described^{18–20} at different CO (low CO at 3 L/min [beat rate=50 bpm], to a normal CO of 5.4 L/min [beat rate=90 bpm], and to a high CO at of 7.2 L/min [beat rate=120 bpm]). The FSI simulations implemented in the CFD enabled us to extract graphs, showing for both ventricles the mean cumulative curves of shear stress distribution (Figure 2) displaying the mean blood volume concerned for each shear value ($n=10000$ for each CO regimen). In the left ventricle, curves showed a gradual increase of blood damage according to the increase of CO (area under curves for

Table 3. Association Between PFHb, VWF, and Hemodynamic Data in the 10 Patients Implanted With the A-TAH (Pulsatile Bioprosthetic Total Artificial Heart)

	CO, L/min	95% CI; P value	Beat rate, bpm	95% CI; P value	Cardiac index	95% CI; P value
HMWM ratio	−0.06	−0.10 to −0.01, $P=0.005$	−0.01	−0.01 to −0.00, $P=0.005$	−0.21	(−0.39 to −0.03, $P=0.011$)
VWF:Rco/VWF:Ag ratio, %	−0.04	−0.06 to −0.01, $P=0.003$	−0.01	−0.02 to −0.01, $P=0.022$	−0.31	(−0.59 to −0.02, $P=0.018$)
PFHb, mg/dL	−2.23	−12.99 to 8.54, $P=0.343$	−0.16	−0.75 to 0.40, $P=0.293$	−0.01	(−0.02 to 0.01, $P=0.109$)

A-TAH indicates Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson); CO, cardiac output; HMWM, high-molecular weight multimers; PFHb, plasma free hemoglobin; VWF:Ag, VWF antigen; and VWF:Rco, VWF activity.

P value of the linear mixed model.

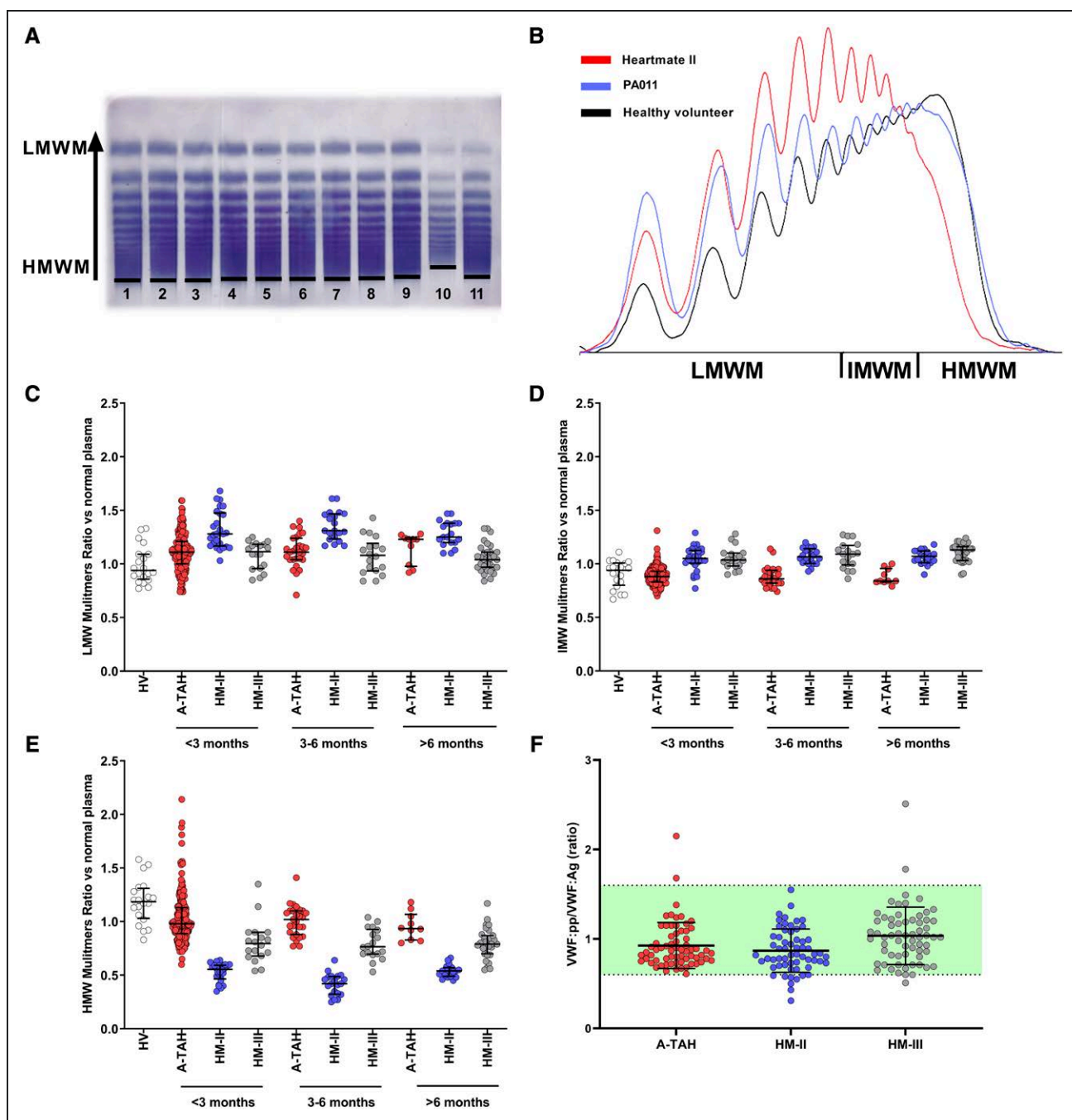


Figure 1. Absence of decrease in HMWM of VWF (von Willebrand factor) after Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson; A-TAH) implantation in 10 patients.

A, Separation of the VWF multimers contained in plasma is performed according to their size using a semi-automated assay: the Hydrigel 5 von Willebrand multimers kit, used with the Hydrasis 2 Scan instrumentation, developed by Sébia. A representative time course of multimers after initiating the Carmat total artificial heart (A-TAH) shown on this electrophoresis gel: A-TAH (tracks 1-9: preop to month 8), plasma samples from one patient with Heartmate II (HM-II; track 10) and a reference standard (pool of normal plasma, track 11). **B**, Multimers densitometry from left low-molecular weight multimers (LMWM) to right high-molecular weight multimers (HMWM) with peaks 1–5 LMWM, 6–10 intermediate molecular weight multimers (IMWM), and above 10 HMWM. A healthy volunteer is indicated by a solid black line and A-TAH samples in blue, while HM-II patients is in red. **C–E**, Quantitative analysis of different pattern of LMWM (**C**), IMWM (**D**), and HMWM (**E**) of VWF in 10 patients implanted with A-TAH, 12 patients implanted with HM-II and 17 patients implanted with Heartmate III (HM-III) after densitometry integration of the gel. The multimers ratio of the reference standard (pool of normal plasma) is 1. No significant difference is observed between A-TAH and healthy volunteers. **F**, Distribution of VWF:pp/VWF:Ag values after A-TAH, HM-II, and HM-III implantation. We observed a normal VWF propeptide/VWF antigen ratio in all studied groups.

the blood volume endured shear stresses is 0.23 for low CO, 0.44 for normal CO, 0.48 for high CO). In the right ventricle, curves also showed gradually increase of blood

damage according to increase of CO (area under curves were 0.28 for low CO, 0.41 for normal CO, 0.49 for high CO). Kolmogorov-Smirnov analysis demonstrated that a

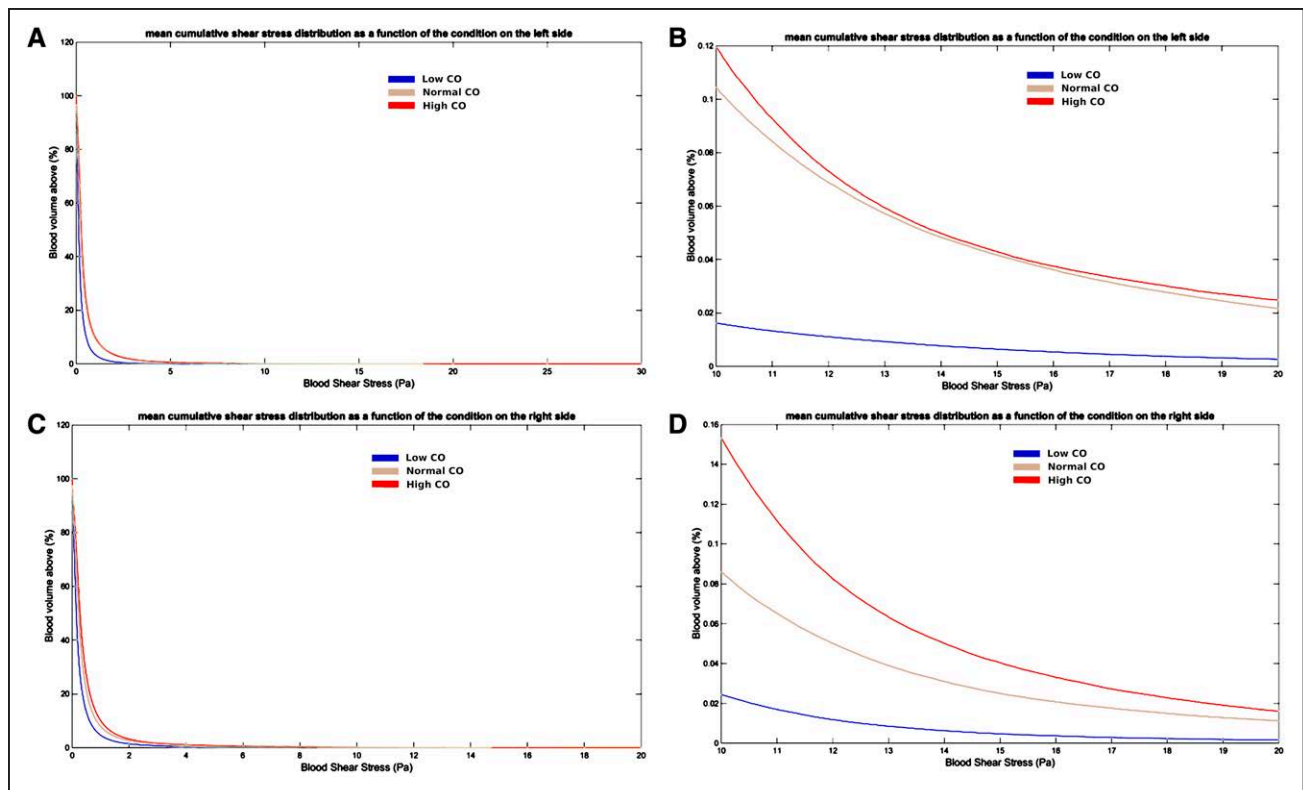


Figure 2. Mean cumulated shear stress distribution during one cycle of contraction in the left and right ventricle.

Simulation results. The y axis is the mean percentage of blood volume subject to a shear stress superior to the x axis corresponding value. Histogram repartition of the shear stress (Pa) inside left ventricle from 0 to 30 Pa in **A** and zoom between 10 and 20 Pa (**B**). Histogram repartition of the shear stress (Pa) inside right ventricle from 0 to 30 Pa in **C** and zoom between 10 and 20 Pa (**D**). CA indicates cardiac output.

significant difference was observed with a $P < 0.001$ in both ventricles between each curves for low CO compared with normal CO and normal CO compared with high CO. In this simulation and according to literature, 17.5 Pa is the cut-off for the HMWM of VWF breakdown.^{18–20} The simulation assessed that $< 0.004\%$ of the blood volume endured shear stresses above 17.5 Pa for low CO, 0.02 for normal CO, 0.03 for high CO in left ventricle. Less than 0.002% of the blood volume endured shear stresses above 17.5 Pa for low CO, 0.01 for normal, 0.02 for high CO in right ventricle. In total, the values over 17.5 Pa were all inferior to 0.03% of the volume for both ventricles in all regimens tested. This percentage can be considered as negligible, and thus simulation predicted no significant VWF impairment. Mean comparison in the whole population, or in shear stress inferior or superior to 17.5 Pa confirmed a significant difference between the 3 regimens tested (Table 4).

We also explored shear stress localization. Indeed, areas with a shear stress above 17.5 Pa were highlighted with red dots during the cycle on the hemodynamic simulation (Videos S1 through S3 for left ventricle respectively for low, normal, and high CO and Videos S4 through S6 for right ventricle respectively for low, normal, and high CO). The graph below the simulation shows the blood volume percentage enduring this shear stress. The videos show that shear stress is not induced by the

device. Indeed, the shear stress localization is mainly near the valves. The flow rate passing through the valve is like physiological flow rate. Therefore, the shear stress induced is not significantly higher than the shear stress generated by a classical surgical valve implantation.

Given results of hemodynamic simulation, we explored the potential association between VWF profile and hemodynamic data. The Table 3 shows a significant inverse association between beat rate, CO and cardiac index on both HMWM and VWF:RCo/VWF:Ag ratio. To illustrate these associations, we confirmed on 2 samples from same patients with different regimen of CO. Figure 3 demonstrates in 4 different patients with different CO a decrease in HMWM ratio when the CO is increasing.

DISCUSSION

In the present study, we investigated the potential relationship between hemolysis, VWF multimers and A-TAH implantation during pivotal study. Hemostasis perturbations have always been major adverse events occurring in VAD, due to high shear stress conditions. Two major blood-flow related mechanisms of the AVWS can be observed in patients with an LVAD: first, an increased shear stress inducing VWF multimers breakdown and, second, a reduced pulsatile stretch causing a decreased VWF release/exocytosis from endothelial cells.^{3–5}

Table 4. Mean Comparison in the Whole Population, or in Shear Stress < or >17.5 Pa Confirmed a Significant Difference Between the 3 Regimen of Cardiac Output Tested in Patients Implanted With the -TAH

	Whole population, n=10000				shear stress <17.5, n=3500			shear stress >17.5, n=6500		
	Group	Mean	SD	P value*	Mean	SD	P value*	Mean	SD	P value*
Left ventricle	Low CO	0.005	0.044	P≤0.001	0.0137	0.0741	P≤0.001	7×10 ⁻⁶	1×10 ⁻⁵	P≤0.001
	Normal CO	0.009	0.059		0.0257	0.0982		8×10 ⁻⁵	7×10 ⁻⁵	
	High CO	0.01	0.063		0.0275	0.1044		1×10 ⁻⁴	8×10 ⁻⁵	
Right ventricle	Low CO	0.006	0.046	P≤0.001	0.0161	0.0767	P≤0.001	5×10 ⁻⁶	6×10 ⁻⁶	P≤0.001
	Normal CO	0.008	0.058		0.023	0.0956		4×10 ⁻⁵	4×10 ⁻⁵	
	High CO	0.01	0.063		0.0283	0.1048		5×10 ⁻⁵	5×10 ⁻⁵	

A-TAH indicates Carmat bioprosthetic total artificial heart (Aeson); and CO, cardiac output.

*P value of the repeated measures 1-way ANOVA model.

Early on, LVADs have been developed for short-term use in patients with end-stage heart failure. In the 1990's, the Food and Drug Administration approved their use for bridge to transplantation. These first-generation LVADs were pulsatile devices, and the first destination therapy study²⁴ demonstrated that their support was associated with a better survival at one year compared with medical treatment, thus suggesting their use for patients ineligible for cardiac transplantation.²⁴ In contrast, the second generation VADs provides continuous flow while partly resolving said issues. These devices are smaller, more durable, and significantly improve the probability of survival free of stroke and reoperation for device repair or replacement at 2 years, compared with the first-generation devices.²⁵ It has been proposed that this superiority was not related to their nonpulsatile nature but only to a better design. Continuous-flow devices, such as HM-II, were corroborated to inflict the AVWS^{4,26} while contributing to increased bleeding risk through decrease in VWF HMWM associated with angiodyplasia and consequently gastrointestinal bleedings.^{27,28} In the present study, VWF degradation was confirmed during HM-II and HM-III support. HM-III is a continuous-flow device mitigating the excessive shear stress while operating with pulsatility, generated by rapid rotor speed modulation. This technology, associated with a lower generated shear stress, allows a decreased HMWM loss in HM-III in contrast to HM-II, as we confirmed in this paper, as well as better preservation against bleeding.²⁹⁻³³ Concerning LVAD-related shear stress, VWF cleavage by ADAMTS-13 is mainly induced by shear stress and lead to reduced VWF size and adhesive activity in a pattern similar to patients with type 2A VWD. Moreover, LVAD-related shear stress also induces unfolding of VWF leading to increased binding and activation of platelets³⁷ that give rise to a consumptive deficiency in large VWF multimers. This shear-induced platelet aggregation depends on the attachment of large VWF multimers to GP Iba and the activation of integrin α IIb β 3.³⁸ Aspirin is widely used to inhibit platelet activation in patients on LVAD support but has been found to be ineffective in vitro to prevent shear-induced and VWF-mediated aggregation of platelets.³⁸ This impossibility for aspirin to abolish VWF-mediated aggregation of platelets

could explain why deleting aspirin from LVAD patients do not modify thrombotic risk.^{39,40} AVWS in LVAD probably have minimal clinical consequences on its own but requires additional event to propagate bleeding and thrombosis.⁴¹ We demonstrated here that patients with HM-II or HM-III with higher PI had a significant decrease level of HMWM ratio. This result is in line with data from Yang et al⁴² who have studied effect of an additional pulsatile flow over axial flow VAD. They have showed that at a specified flow rate, a laminar flow under steady-state condition may become disturbed under pulsatile condition. Thus, they suggested that the contribution of pulsatility by the native heart might induce a periodic disturbance to an otherwise stable flow field within an axial flow VAD. However, this assay has not been performed with whole blood and it constitutes a real limitation for our hypothesis. Moreover, higher PI association with decreased level of HMWM ratio in HM-II and HM-III are not in the line with Wever-Pinzon et al²³ results demonstrating that patients implanted with HM2 with high PI had better clinical outcomes (lower risk of nonsurgical bleeding). Our results on PI and HMWM are in line with recent data proposing that the artificial pulsatility of the HM-III does not avert the progression of endothelial dysfunction⁴³ and confirm relevance of link between VWF degradation and shear stress.

A-TAH, which is a fully pulsatile device, offered a better preservation of HMWM during follow-up than HM-II and HM-III. Indeed, the patients implanted with the A-TAH presented a VWF multimeric profile similar to HV, without any relevant variation along time. In addition, among the patients implanted with the A-TAH, only 1.4% of the samples presented an increased PFHb (>20 mg/dL) fulfilling hemolysis definition based on the INTERMACS classification.³⁴ One of them was found increased due to a surgical re-intervention, and normalized the next day. The other 2 were isolated and normalized on the next sample without any treatment. These results confirm the absence of relevant clinical hemolysis events already reported during the A-TAH support. Furthermore, the shear stress operated by the A-TAH seems to remain in the physiological range without hemolysis, even in case of an increased flow. These data are consistent with findings from previous in vivo studies

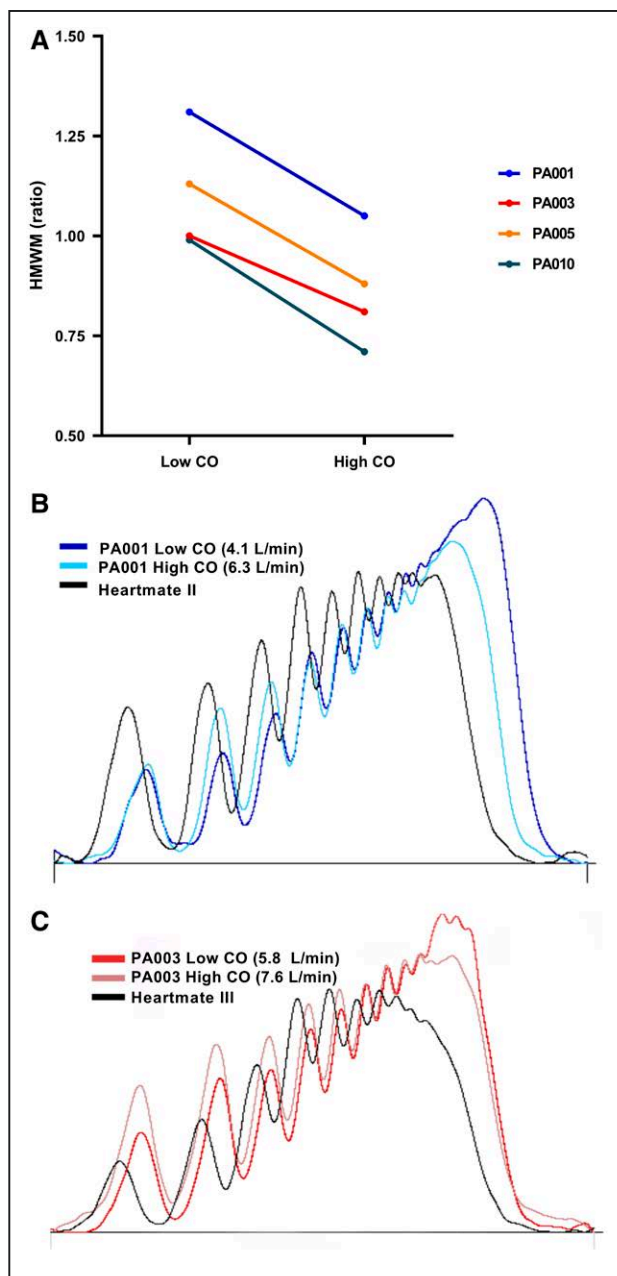


Figure 3. High-molecular weight multimers (HMWM) in 4 different patients at 2 different time point with low and high cardiac output (CO).

A, We can observe a decrease in VWF (von Willebrand factor) HMWM ratio when the CO is increasing in PA001, PA003, PA005, and PA010. We tested determinate high and low values with samples above and beyond the median (median=6.06 L/min). For PA001, low CO=4.1 L/min and high CO=6.3 L/min; for PA003, low CO=5.8 L/min and high CO=7.6 L/min; for PA005, low CO=5.5 L/min and high CO=6.9 L/min; and for PA010 low CO=4.0 L/min and high CO=6.2 L/min. **B** and **C**, VWF multimers densitometry for PA001 and PA003 at 2 different time points with a low and a high CO in contrast to, respectively, a patient with HeartMate II (HM-II) and HeartMate III (HM-III).

with manual mode A-TAH setting. No AVWS, no bleeding, and no thrombotic complications were observed in calves implanted with the A-TAH, despite the absence of anticoagulation.³⁵ Feasibility studies in patients implanted with

the A-TAH in manual mode showed that neither hemolysis nor thrombotic complications were reported and explant analysis of all devices combined with autopsy examinations revealed no apparent evidence of thrombosis.^{6,8} Herein, we described that the autoregulated mode also preserves patients from hemolysis and AVWS while allowing them to perform physical activities, during which CO is increased by beat rate acceleration in response to a preload increase. We showed that modification of shear stress conditions, through CO and beat rate variations, is associated with changes in VWF multimeric pattern while remaining in physiological range. The left minimal ejection pressure threshold is a parameter integrated into the A-TAH algorithm that ensures such pulsatility. Indeed, it corresponds to the target for a minimum average of the left outlet pressure, designed to avoid cases of low arterial pressure. It constitutes an adjustable parameter with a default value defined at 90 mmHg. Using computer simulated model, we aimed to define alteration of blood function linked to mechanical stresses. For this, the literature indicates that it relates to shear stress and the time of exposure to this shear stress. Three damages are feared: hemolysis, platelet activation and alteration of vWF. The latter is the most sensitive to shear stress and deteriorates from 17.5 Pa. The volume of blood subjected to a shear stress >17.5 Pa during a cardiac cycle is therefore an indicator making it possible to assess VWF degradation. It is imperfect because it does not take into account the distribution of shear stress, and it does not directly quantify the effects on the patient. Concerning hemolysis index, we previously described it was inferior to $1.51 \times 10^{-7}\%$ in A-TAH (% is percentage of blood exposed is for one cardiac cycle),²⁰ lower than an estimated physiological value since the estimated hemolysis index after one passage through the blood system was is $5.8 \times 10^{-4}\%$.³⁶ Although the blood damage will be accumulated on each cardiac cycle, there is a renewal of the blood, which compensates for its damage. We can give an order of magnitude. If the blood makes one cycle in 1 minute (assumption of 6 L/min for 6 L of blood), we have <6% of the blood which is exposed to a shear stress >17.5 Pa per day.

Moreover, it has been previously demonstrated that the VWF defect reflects the balance between degradation induced by the shear stress and the endothelial release of new VWF triggered by the pulsatility and preservation of pulsatility has been proposed as a target to improve clinical outcomes of patients.³ VWF release is operated by endothelial cells. However, it has been shown that endothelial function was profoundly altered in patients implanted with continuous-flow LVAD⁴⁴ and similarly with the A-TAH in manual mode.⁴⁵ In manual mode A-TAH, this is probably due to venous stasis secondary to the absence of physiological variation of flow in these devices. In contrast, endothelial integrity is preserved in autoregulated mode, which offers a good cellular function, contributing to hemocompatibility.⁴⁵ Absence of AVWS after A-TAH implantation might be explain mainly by very low shear

stress inside the prosthesis. Our findings of propeptide evaluation also strongly suggests that VWF clearance is well preserved with pulsatile A-TAH in autoregulated mode. Therefore, the higher VWF:Ag levels observed in patients with A-TAH, compared with HM-II and HM-III, is indicative of an increased release of VWF by the vascular endothelium, likely because of the endothelium stimulation by the pulsatile flow like previously described.³ Thus, VWF propeptide combined with HMWM evaluation after A-TAH allow us to confirm relevance of VWF as a sensor of both pulsatility and shear stress.

Our study present some limitations. First, according to INTERMACS, patients implanted with HM2 or HM3 are in much worse clinical condition than patients implanted with A-TAH. Moreover, another limitation of our study is the poor number of patients with a very long-term follow-up over 6 months. Finally, loss of VWF HMWM is in general selectively restricted to the highest multimers, which are poorly visualized using SEBIA Hydrigel 5 VWF multimers. The normal postimplantation of A-TAH ratio of VWF HMWM observed could not allow detecting a mild HMWM defect or a mild residual abnormal shear inducing a degradation of these highest multimers because of sensitivity of SEBIA Hydrigel 5 VWF multimers. However, we previously described a normal distribution of HMWM in feasibility study with A-TAH in manual mode⁷ as well as a normal distribution after A-TAH implantation in calve³⁵ with the classic reference method by Western blot that make confident results proposed here.

All in all, the autoregulated A-TAH seems to provide physiological blood flow with no hemolysis and no AVWS, thereby potentially reducing the risk of clinically relevant hemocompatibility-related adverse events. Moreover, we confirm that VWF is a good biological sensor of blood flow and pulsatility in cardiac assistance. Influence of shear stress and pulsatile flow on vascular function but also VWF involvement in hemocompatibility-related side effect need further exploration to make in the future the most relevant mechanical circulatory support to improve outcomes of patients.

ARTICLE INFORMATION

Received June 14, 2021; accepted January 25, 2022.

Affiliations

Université de Paris, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France (B.P., A.C., C.L.). Cardiac Surgery Department and Biosurgical Research lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, France (B.P., A.C., C.L.). Carmat SAS, Velizy-Villacoublay, France (B.P., U.R., M.G., A.C., P.J.). Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France, Emergency department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, France (R.C.). Université de Paris, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France, Hematology department and Biosurgical Research lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, France (C.P., A.P., N.R., U.R., N.G., J.B., J.R., D.M.S.). National Research Cardiac, Surgery Center, Nur-Sultan, Kazakhstan (Y.P., M.B.). Université de Paris, Cardiac Surgery Department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, France (M.C.B.). AP-HP, Biochemistry Department, Georges Pompidou European Hospital, France (B.V.). Cardiac and thoracic Surgery Department, CHU de Nantes, hôpital Nord Laënnec, boulevard Jacques-Monod, France (J.C.R.). Department of Bioinformatics, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris,

Paris, France (A.-S.J.), Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic (P.I., I.N.).

Acknowledgments

We would like to thank Sébia for collaboration and support in Willebrand multimers evaluation. We would like to thank medical and nursing staff of cardiovascular intensive care unit, cardiology and surgery departments involved in patient's follow-up

Sources of Funding

The CE Mark Carmat Study was sponsored by Carmat-SA, and this work was supported by Carmat-SA.

Disclosures

Drs Smadja, Netuka, Ivak, and Latremouille received consulting fees from CARMAT-SA. A. Capel is cofounder and shareholder of CARMAT-SA. CARMAT-SA employs Dr Poitier, A. Capel, Dr Roussel, and Dr Jansen. Dr Poitier, Dr Richez, and C. Peronino received grant financial support during their MSc and PhD. Role and contribution of each author: Drs Poitier and Chocron analyzed the data and wrote the article. C. Peronino, Dr Rivet, Dr Richez, Dr Gendron, J. Rancic, Dr Philippe, Dr Vedie performed and analyzed the data. Drs Pya, Bekbossynova, Bories, Roussel, Ivak, Latremouille, and Netuka included patients and reviewed the article. A. Capel, Dr Roussel, and Dr Jansen organized clinical trials. A Carpentier is inventor of A-TAH and reviewed the article. Dr Smadja supervised the work, analyzed the data and wrote the article. The other authors report no conflicts.

Supplemental Materials

Tables S1–S5
 Figures S1–S3
 References²³
 Videos S1–S6

REFERENCES

1. Lanfear AT, Hamandi M, Fan J, DiMaio JM, George TJ. Trends in HeartMate 3: what we know so far. *J Card Surg*. 2020;35:180–187. doi: 10.1111/jocs.14319
2. Lenting PJ, Christophe OD, Denis CV, von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood*. 2015;125:2019–2028. doi: 10.1182/blood-2014-06-528406
3. Vincent F, Rauch A, Loobuyck V, Robin E, Nix C, Vincentelli A, Smadja DM, Leprince P, Amour J, Lemesle G, et al. Arterial pulsatility and circulating von Willebrand factor in patients on mechanical circulatory support. *J Am Coll Cardiol*. 2018;71:2106–2118. doi: 10.1016/j.jacc.2018.02.075
4. Bartoli CR, Zhang D, Kang J, Hennessy-Strahs S, Restle D, Howard J, Redline G, Bermudez C, Atluri P, Acker MA. Clinical and in vitro evidence that subclinical hemolysis contributes to LVAD thrombosis. *Ann Thorac Surg*. 2018;105:807–814. doi: 10.1016/j.athoracsur.2017.05.060
5. Bartoli CR, Restle DJ, Zhang DM, Acker MA, Atluri P. Pathologic von Willebrand factor degradation with a left ventricular assist device occurs via two distinct mechanisms: mechanical demolition and enzymatic cleavage. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;149:281–289. doi: 10.1016/j.jtcvs.2014.09.031
6. Carpentier A, Latremouille C, Cholley B, Smadja DM, Roussel JC, Boissier E, Trochu JN, Gueffet JP, Treillot M, Bizouarn P, et al. First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *Lancet*. 2015;386:1556–1563. doi: 10.1016/S0140-6736(15)60511-6
7. Smadja DM, Saubaméa B, Susen S, Kindo M, Bruneval P, Van Belle E, Jansen P, Roussel JC, Latremouille C, Carpentier A. Bioprosthetic total artificial heart induces a profile of acquired hemocompatibility with membranes recellularization. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70:404–406. doi: 10.1016/j.jacc.2017.05.021
8. Latremouille C, Carpentier A, Leprince P, Roussel JC, Cholley B, Boissier E, Epailly E, Capel A, Jansen P, Smadja DM. A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: results from a pilot study. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:33–37. doi: 10.1016/j.healun.2017.09.002
9. Bizouarn P, Roussel JC, Trochu JN, Perlès JC, Latremouille C. Effects of pre-load variations on hemodynamic parameters with a pulsatile autoregulated artificial heart during the early post-operative period. *J Heart Lung Transplant*. 2018;37:161–163. doi: 10.1016/j.healun.2017.06.018
10. Netuka I, Pya Y, Bekbossynova M, Ivak P, Konarik M, Gustafsson F, Smadja DM, Jansen P, Latremouille C. Initial bridge to transplant experience with a bioprosthetic autoregulated artificial heart. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39:1491–1493. doi: 10.1016/j.healun.2020.07.004

11. Pikta M, Zemstovskaja G, Bautista H, Nouadje G, Szanto T, Viigimaa M, Banyas V. Preclinical evaluation of a semi-automated and rapid commercial electrophoresis assay for von Willebrand factor multimers. *J Clin Lab Anal*. 2018;32:e22416. doi: 10.1002/jcla.22416
12. Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H, Westhofen P, Stufano F, Goodeve A, Kitchen S, Makris M. Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018;2:790–799. doi: 10.1002/rth2.12141
13. Philippe A, Chocron R, Gendron N, Bory O, Beauvais A, Peron N, Khider L, Guerin CL, Goudot G, Levasseur F, et al. Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. *Angiogenesis*. 2021;24:505–517. doi: 10.1007/s10456-020-09762-6
14. Smadja DM, Goudot G, Gendron N, Zarka S, Puymirat E, Philippe A, Spaulding C, Peronino C, Tanter M, Pernot M, et al. Von Willebrand factor multimers during non-invasive ultrasound therapy for aortic valve stenosis. *Angiogenesis*. 2021;24:715–717. doi: 10.1007/s10456-021-09803-8
15. Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP. Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood*. 2001;98:1765–1772. doi: 10.1182/blood.v98.6.1765
16. Horiuchi H, Doman T, Kokame K, Saiki Y, Matsumoto M. Acquired von willebrand syndrome associated with cardiovascular diseases. *J Atheroscler Thromb*. 2019;26:303–314. doi: 10.5551/jat.RV17031
17. Egger C, Maas J, Hufen T, Schmitz-Rode T, Steinseifer U. Establishing a method for in vitro investigation of mechanical parameters causing acquired von Willebrand syndrome in ventricular assist devices. *Artif Organs*. 2013;37:833–839. doi: 10.1111/aor.12116
18. Luraghi G, Wu W, De Castilla H, Rodriguez Matas JF, Dubini G, Dubuis P, Grimmé M, Migliavacca F. Numerical approach to study the behavior of an artificial ventricle: fluid-structure interaction followed by fluid dynamics with moving boundaries. *Artif Organs*. 2018;42:E315–E324. doi: 10.1111/aor.13316
19. Luraghi G, Wu W, De Gaetano F, Rodriguez Matas JF, Moggridge GD, Serrani M, Stasiak J, Costantino ML, Migliavacca F. Evaluation of an aortic valve prosthesis: fluid-structure interaction or structural simulation? *J Biomech*. 2017;58:45–51. doi: 10.1016/j.jbiomech.2017.04.004
20. Richez U, De Castilla H, Guerin CL, Gendron N, Luraghi G, Grimme M, Wu W, Taverna M, Jansen P, Latremouille C, et al. Hemocompatibility and safety of the Carmat Total Artificial Heart hybrid membrane. *Heliyon*. 2019;5:e02914. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02914
21. Stufano F, Boscarino M, Bucciarelli P, Baronciani L, Maino A, Cozzi G, Peyvandi F. Evaluation of the utility of von Willebrand factor propeptide in the differential diagnosis of von Willebrand disease and acquired von Willebrand syndrome. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45:36–42. doi: 10.1055/s-0038-1660481
22. Ashbrook M, Walenga JM, Schwartz J, Heroux A, Jeske WP, Escalante V, Bakhos M. Left ventricular assist device-induced coagulation and platelet activation and effect of the current anticoagulant therapy regimen. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2013;19:249–255. doi: 10.1177/1076029612464900
23. Wever-Pinzon O, Selzman CH, Drakos SG, Saidi A, Stoddard GJ, Gilbert EM, Labedi M, Reid BB, Davis ES, Kfoury AG, et al. Pulsatility and the risk of nonsurgical bleeding in patients supported with the continuous-flow left ventricular assist device HeartMate II. *Circ Heart Fail*. 2013;6:517–526. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.112.000206
24. Rose EA, Gelijns AC, Moskowitz AJ, Heitjan DF, Stevenson LW, Dembitsky W, Long JW, Ascheim DD, Tierney AR, Levitan RG, et al; Randomized Evaluation of Mechanical Assistance for the Treatment of Congestive Heart Failure (REMATCH) Study Group. Long-term use of a left ventricular assist device for end-stage heart failure. *N Engl J Med*. 2001;345:1435–1443. doi: 10.1056/NEJMoa012175
25. Slaughter MS, Rogers JG, Milano CA, Russell SD, Conte JV, Feldman D, Sun B, Tatooles AJ, Delgado RM III, Long JW, et al; HeartMate II Investigators. Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N Engl J Med*. 2009;361:2241–2251. doi: 10.1056/NEJMoa0909938
26. Fraser KH, Zhang T, Taskin ME, Griffith BP, Wu ZJ. A quantitative comparison of mechanical blood damage parameters in rotary ventricular assist devices: shear stress, exposure time and hemolysis index. *J Biomech Eng*. 2012;134:081002. doi: 10.1115/1.4007092
27. Randi AM, Laffan MA, Starke RD. Von Willebrand factor, angiodyplasia and angiogenesis. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5:e2013060. doi: 10.4084/MJHID.2013.060
28. Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood*. 2018;132:132–140. doi: 10.1182/blood-2018-01-769018
29. Netuka I, Kvasnička T, Kvasnička J, Hrachovinová I, Ivák P, Mareček F, Bilková J, Malíková I, Jančová M, Malý J, et al. Evaluation of von Willebrand factor with a fully magnetically levitated centrifugal continuous-flow left ventricular assist device in advanced heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2016;35:860–867. doi: 10.1016/j.healun.2016.05.019
30. Uriel N, Colombo PC, Cleveland JC, Long JW, Salerno C, Goldstein DJ, Patel CB, Ewald GA, Tatroles AJ, Silvestry SC, et al. Hemocompatibility-related outcomes in the MOMENTUM 3 trial at 6 months: a randomized controlled study of a fully magnetically levitated pump in advanced heart failure. *Circulation*. 2017;135:2003–2012. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.117.028303
31. Bansal A, Uriel N, Colombo PC, Narisetty K, Long JW, Bhimaraj A, Cleveland JC Jr, Goldstein DJ, Stulak JM, Najjar SS, et al. Effects of a fully magnetically levitated centrifugal-flow or axial-flow left ventricular assist device on von Willebrand factor: a prospective multicenter clinical trial. *J Heart Lung Transplant*. 2019;38:806–816. doi: 10.1016/j.healun.2019.05.006
32. Geisen U, Brehm K, Trummer G, Berchtold-Herz M, Heilmann C, Beyersdorf F, Schelling J, Schlagenhaut A, Zieger B. Platelet secretion defects and acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist devices. *J Am Heart Assoc*. 2018;7:e006519. doi: 10.1161/JAHA.117.006519
33. Geisen U, Heilmann C, Beyersdorf F, Benk C, Berchtold-Herz M, Schlensak C, Budde U, Zieger B. Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;33:679–684. doi: 10.1016/j.ejcts.2007.12.047
34. Kormos RL, Antonides CFJ, Goldstein DJ, Cowger JA, Starling RC, Kirklín JK, Rame JE, Rosenthal D, Mooney ML, Caliskan K, et al. Updated definitions of adverse events for trials and registries of mechanical circulatory support: a consensus statement of the mechanical circulatory support academic research consortium. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39:735–750. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.010
35. Smadja DM, Susen S, Rauch A, Cholley B, Latrémouille C, Duveau D, Zilberstein L, Méléard D, Boughenou MF, Belle EV, et al. The carmat bioprosthetic total artificial heart is associated with early hemostatic recovery and no acquired von Willebrand syndrome in calves. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2017;31:1595–1602. doi: 10.1053/j.jvca.2017.02.184
36. Goubergrits L, Affeld K. Numerical estimation of blood damage in artificial organs. *Artif Organs*. 2004;28:499–507. doi: 10.1111/j.1525-1594.2004.07265.x
37. Ikeda Y, Handa M, Kawano K, Kamata T, Murata M, Araki Y, Anbo H, Kawai Y, Watanabe K, Itagaki I. The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J Clin Invest*. 1991;87:1234–1240. doi: 10.1172/JCI115124
38. Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood*. 1988;71:1366–1374.
39. Litzler PY, Smail H, Barbay V, Nafeh-Bizet C, Bouchart F, Baste JM, Briou C, Bessou JP. Is anti-platelet therapy needed in continuous flow left ventricular assist device patients? A single-centre experience. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2014;45:55–9; discussion 59. doi: 10.1093/ejcts/ezt228
40. Netuka I, Litzler PY, Berchtold-Herz M, Flecher E, Zimpfer D, Damme L, Sundareswaran KS, Farrar DJ, Schmitt J; EU TRACE Investigators. Outcomes in HeartMate II Patients With No Antiplatelet Therapy: 2-Year Results From the European TRACE Study. *Ann Thorac Surg*. 2017;103:1262–1268. doi: 10.1016/j.athoracsur.2016.07.072
41. Nascimbene A, Neelamegham S, Frazier OH, Moake JL, Dong JF. Acquired von Willebrand syndrome associated with left ventricular assist device. *Blood*. 2016;127:3133–3141. doi: 10.1182/blood-2015-10-636480
42. Yang F, Kormos RL, Antaki JF. High-speed visualization of disturbed pathlines in axial flow ventricular assist device under pulsatile conditions. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;150:938–944. doi: 10.1016/j.jtcvs.2015.06.049
43. Ivák P, Netuka I, Tucanova Z, Wohlfahrt P, Konárik M, Szarsoz O, Novakova S, Kubanek M, Lanska V, Pirha J. The effect of artificial pulsatility on the peripheral vasculature in patients with continuous-flow ventricular assist devices. *Can J Cardiol*. 2021;37:1578–1585. doi: 10.1016/j.cjca.2021.05.013
44. Watanabe A, Amiya E, Hatano M, Watanabe M, Ozeki A, Nitta D, Maki H, Hosoya Y, Tsuji M, Bujo C, et al. Significant impact of left ventricular assist device models on the value of flow-mediated dilation: effects of LVAD on endothelial function. *Heart Vessels*. 2020;35:207–213. doi: 10.1007/s00380-019-01474-2
45. Smadja DM, Chocron R, Rossi E, Poitier B, Pya Y, Bekbossynova M, Peronino C, Rancic J, Roussel JC, Kindo M, et al. Autoregulation of pulsatile bioprosthetic total artificial heart is involved in endothelial homeostasis preservation. *Thromb Haemost*. 2020;120:1313–1322. doi: 10.1055/s-0040-1713751

Supplemental Materials

Bioprosthetic total artificial heart in autoregulated mode induces biological hemocompatibility: Insights for Multimers of von Willebrand factor

Bastien Poitier ^{1,2}, Richard Chocron ³, Christophe Peronino ⁴, Aurélien Philippe ⁴, Yuri Pya ⁵, Nadia Rivet ⁴, Ulysse Richez ^{2,4}, Mahabbat Bekbossynova ⁵, Nicolas Gendron ⁴, Marc Grimmé ², Marie Cécile Bories ⁶, Julie Brichet ⁴, Antoine Capel ², Jeanne Rancic ⁴, Benoit Vedie ⁷, Jean Christian Roussel ⁸, Anne-Sophie Jannot ⁹, Piet Jansen ², Alain Carpentier ¹, Peter Ivak ¹⁰, Christian Latremouille ¹, Ivan Netuka ¹⁰ and David M. Smadja ⁴

¹ Université de Paris, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France, Cardiac Surgery Department and Biosurgical Research lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

² Carmat SAS, Velizy-Villacoublay, France

³ Université de Paris, PARCC, INSERM, F-75015 Paris, France, Emergency department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁴ Université de Paris, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France, Hematology department and Biosurgical Research lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁵ National Research Cardiac, Surgery Center, Nur-Sultan, Kazakhstan

⁶ Université de Paris, Cardiac Surgery Department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁷ AP-HP, Biochemistry Department, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁸ Cardiac and thoracic Surgery Department, CHU de Nantes, hôpital Nord Laënnec, boulevard Jacques-Monod, Saint-Herblain, 44093 Nantes cedex 1, France

⁹ Department of Bioinformatics, Hôpital Européen Georges Pompidou, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France

¹⁰ Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

Running title: **Bioprosthetic artificial heart hemocompatibility**

Corresponding authors: David M. Smadja. Georges Pompidou European Hospital, Hematology department, 20 rue Leblanc, 75015 Paris. Tel: +33156093933

Email: david.smadja@aphp.fr

Table S1: Clinical characteristics of patients implanted with A-TAH

BSA : body surface area ; DT : Destination therapy , BTT: bridge-to-transplant.

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Age (year)	68	60	58	68	66	35	57	60	54	70
Gender	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male
BSA (m²)	2	1.96	2.06	1.93	2.13	2.2	1.89	1.96	2	2.06
Cardiac index (L/min/m²)	2	2.15	1.55	1.76	1.24	1.34	1.66	2.66	1.74	1.6
Intermacs Class	3	3	3	3	4	3	3	3	2	3
Indication	DT	BTT	BTT	DT	DT	BTT	BTT	BTT	BTT	DT
Support Duration (days)	47	243	75	270	599	155	304	14	109	271

Table S2: Bleeding events in patients implanted with A-TAH or HM-II/III

Bleeding event characteristics	A-TAH	HM-II	HM-III
Patients suffering from bleeding complications, n (%)	1 (10.0)	7 (58.3)	8 (47.1)
Event day (POD), ± SD	7/43/64	294.9±334.3	118.6±141.3
Bleeding event type, n			
Gastrointestinal	0	5	7
Epistaxis	2	4	2
Genitourinary	0	0	1
Intracranial	0	1	1
Other	1	1	0
BARC type of bleeding events, n (%)			
1	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
2	2 (66.7)	8 (72.7)	7 (63.6)
3a	1 (33.3)	2 (18.2)	1 (9.1)
3b	0 (0)	1 (9.1)	3 (27.3)
3c	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
4	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
5a	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)
5b	0 (0)	0 (0.0)	0 (0.0)

Table S3: Thrombotic events in patients implanted with HM-II/III

Device / Patient	Thrombotic event	Event day (POD)	Treatment	Death
HM3 Patient 1	- Non-occlusive outflow graft thrombosis	180	Medical follow-up	0
HM2 Patient 1	- Intra stent thrombosis (superficial femoral artery) without pump thrombosis	216	Femoro popliteal bypass	0
HM2 Patient 1	- Pump thrombosis complicated with superficial femoral artery intra stent emboli	257	- Cardiac transplantation - Arterial thrombo-aspiration	0
HM2 Patient 2	- Hemorrhagic infarctive stroke	148	Anticoagulant treatment suspension	0
HM2 Patient 2	- Pump thrombosis complicated with massive sylvian stroke	200	None	1
HM2 Patient 3	- Outflow graft thrombosis	935	Surgical outflow graft thrombectomy	0

Table S4: Number of samples available for each patient's group in the 3 periods of time post implantation

	<3 months	Month 3 – Month 6	>Month 6
A-TAH	206	27	10
HM-II	26	20	19
HM-III	18	18	31

Table S5: PT, K-aPTT and fibrinogen levels in the 10 patients implanted with the A-TAH (pulsatile bioprosthetic total artificial heart)

PT: prothrombin time; K-aPTT: Kaolin-activated partial thromboplastin time; SD: standard deviation.

	Before implantation	< Month 3	Month 3 - Month 6	> Month 6
PT (%), mean (SD)	74.64 (1.96)	74.82 (14.28)	77.50 (7.30)	75.40 (14.50)
K-aPTT – sec, mean (SD)	31.2 (16.62)	36.8 (12.5)	32.8 (2.5)	33.9 (7.6)
Fibrinogen- g/L, mean (SD)	5.97 (1.06)	5.95 (1.04)	5.28 (1.01)	4.61 (0.86)

Figure S1: Quantification of VWF antigen in 10 patients implanted with A-TAH, 12 patients implanted with HM-II and 17 patients implanted with HM-III

A-TAH: CARMAT total artificial heart; HM-II: Heartmate II; HM-III: Heartmate III; VWF: von Willebrand factor; <3: <3 months; 3-6: between 3 and 6 months; >6: > 6 months.

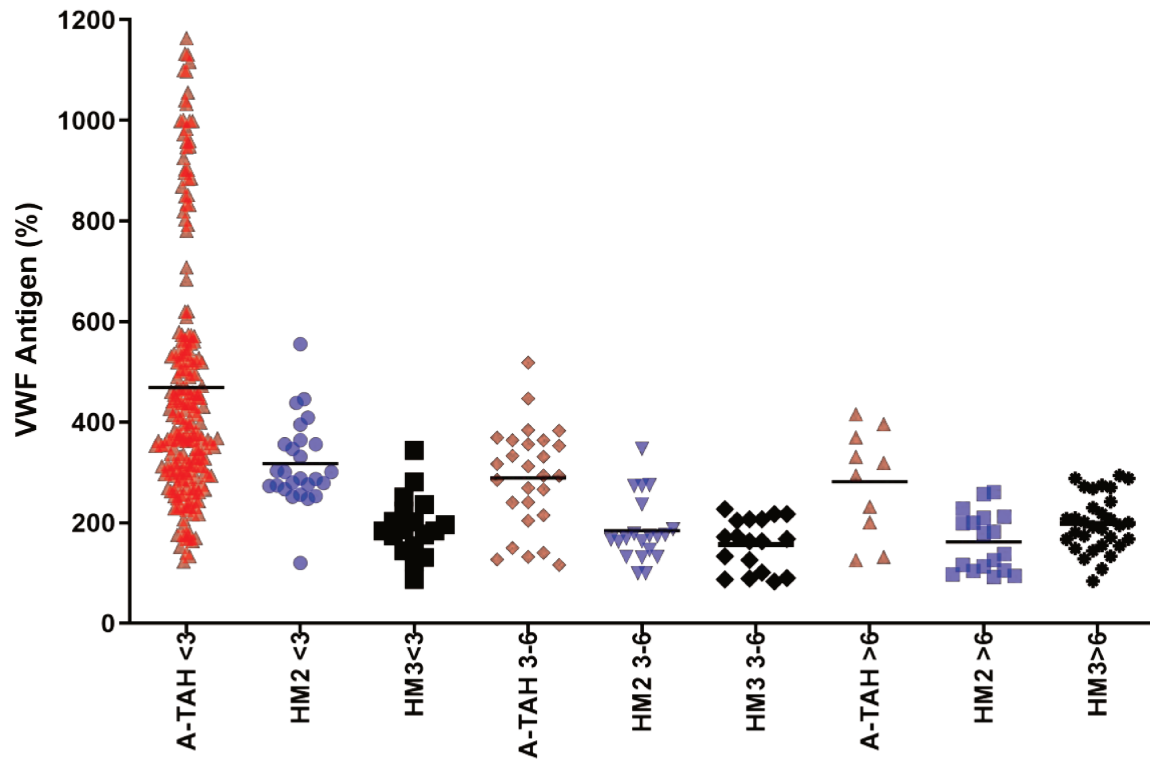


Figure S2: HMWM individual variability according to the 3 periods of time post implantation with individual samples from patients with the longer follow-up

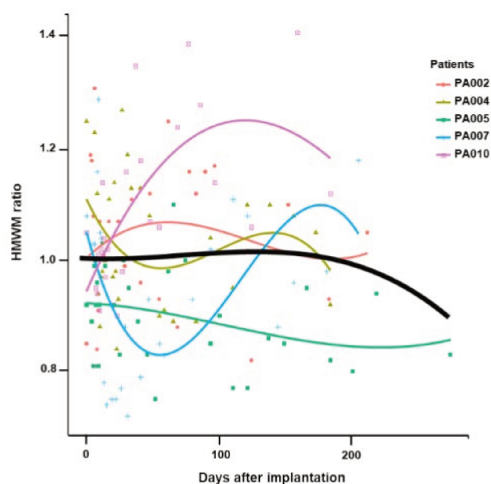
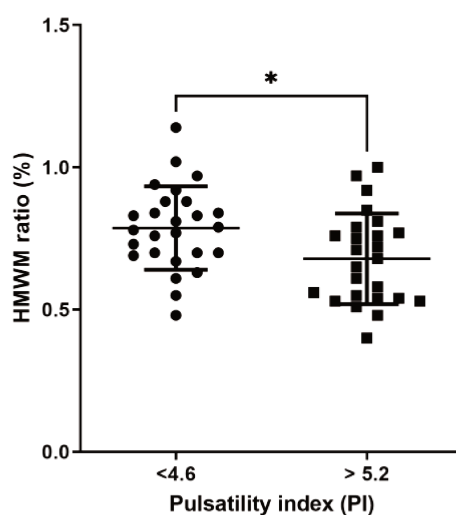


Figure S3: HMWM ratio according to pulsatility index (PI) in HM-II and HM-II patients.

We referred to the pulsatility index (PI) estimated by the heart mate devices. PI is a calculation corresponding to heart pulsatility depending on LVAD speed and preload. We compared high and low pulsatility index as defined by Wever-Pinzon et al (23). We compared HMWM ratio for PI >5.2 vs PI <4.6. We found that higher PI was significantly associated with lower HMWM ratio ($p=0.018$).



MAJOR RESOURCES TABLES

Non applicable

3.3. Bioprosthetic Total Artificial Heart Implantation Does Not Induce Chronic Inflammation

Dans cette étude, notre but était de déterminer le statut inflammatoire de 9 patients implantés avec l'A-TAH grâce à une cinétique de prélèvements sur un suivi d'un an. Nous avons ainsi suivi les taux de leucocytes et des sous populations inflammatoires par cytométrie de flux ainsi que le profil des cytokines inflammatoires par technique multiplex/luminex.

Les résultats ont montré que le taux de leucocytes n'est pas modifié de manière significative après implantation avec l'A-TAH (coefficient du modèle linéaire mixte avec CI 95%, -0.05 (-0.71 à -0.61) ; $p = 0.44$). Nous avons comparé la distribution des sous-populations de cellules immunitaires circulantes par cytométrie en flux : Aucune des populations explorées n'a eu subi de modification significative durant les 12 mois de suivi clinique (toutes les p -values > 0.05). Nous avons également analysé les cytokines inflammatoire durant le support avec l'A-TAH et nous n'avons pas observé de modification significative du profil inflammatoire en comparaison avec les prélèvements pré-implantation (toutes les p -values > 0.05).

En conclusion, nous avons démontré dans ce travail l'absence de signal inflammatoire dans le sang périphérique sur une période de 12 mois de suivi durant l'implantation avec le cœur artificiel total Aeson de Carmat.

Bioprosthetic Total Artificial Heart Implantation Does Not Induce Chronic Inflammation

CHRISTOPHE PERONINO,^{*,†,‡} CORALIE L. GUERIN,^{§,¶} PETER IVAK,^{||} LÉA GUYONNET,[§] RICHARD CHOCRON,[#] GRÉGOIRE DETRICHÉ,^{*,†} CHRISTIAN LATREMOUILLE,[‡] MAXIME GRUEST,^{*,†} AURÉLIEN PHILIPPE,^{*,†} ANTOINE CAPEL,^{||} YURI PYA,^{**} ANNE-CÉLINE MARTIN,^{††,‡‡} PIET JANSEN,[‡] NICOLAS GENDRON,^{||,*,†} IVAN NETUKA,^{||,*,†} AND DAVID M. SMADJA,^{||,*,†}

The Aeson total artificial heart (A-TAH) has been developed for patients at risk of death from biventricular failure. We aimed to assess the inflammatory status in nine subjects implanted with the A-TAH in kinetics over one year. Laboratory assessment of leukocyte counts, inflammatory cytokines assay, and peripheral blood mononuclear cell collection before and after A-TAH implantation. Leukocyte counts were not significantly modulated according to time after A-TAH implantation (coefficient of the linear mixed effect model with 95% CI, -0.05 (-0.71 to -0.61); $p = 0.44$). We explored inflammatory cytokine after A-TAH and did not observe, at any time, a modified profile compared to pre-implantation values (all p -values > 0.05). Finally, we compared the distribution of circulating immune cell subpopulations identified based on sequential expression patterns for multiple clusters of differentiation. None of the population explored had significant modulation during the 12-month follow-up (all p -values > 0.05). In conclusion, using a cytokine multiplex assay combined with a flow cytometry approach, we demonstrated the absence of inflammatory signals in peripheral blood over a period of 12 months following A-TAH implantation. *ASAIO Journal* 2022; 68:e173–e178

Key Words: aeson, cytokines, inflammation, leukocytes, total artificial heart, transplantation

Mechanical circulatory support such as the left ventricular assistance device (LVAD) demonstrates a number of important drawbacks including thrombosis, bleeding, and infection. One of the main trigger of these events is chronic inflammation. In patients supported by a durable LVAD, a chronic inflammation and immune dysfunction^{1–4} associated with granulocyte activation⁵ have been described. From a more general perspective, accumulating evidence suggests that immune response and inflammation are central to the onset of long-term cardiac complications and heart remodeling following acute heart infarction, for example.^{6,7} In fact, inflammation triggers the recruitment and proliferation of immune-inflammatory cells, contributing to either fibrosis or the production and degradation of extracellular matrix proteins. It has been pinpointed that several immune cell types were mobilized after myocardial ischemia-reperfusion.

The Aeson total artificial heart (A-TAH, Carmat, Vélizy Villacoublay, France) has been used as bridge-to-transplant and destination therapy for patients at risk of death from biventricular failure⁸. The A-TAH is an autoregulated and pulsatile mechanical circulatory support with improved biocompatibility in contrast to classic ventricular assistance devices, which reduces thrombotic, bleeding, and infectious complication rates^{9,10}. Surfaces of A-TAH in contact with the patient's blood are made of a hybrid membrane in bovine pericardial tissue processed with glutaraldehyde¹¹. Indeed, we recently demonstrated a recellularization with fibrin deposit, inflammatory cells, and endothelialization of this hybrid membrane¹². This complete recellularization process re-creates a humanized antithrombotic tissue on top of pericardial tissue in the same circumstances of bioprosthetic valve¹³. Because A-TAH implantation induces a reperfusion state after a period of cardiac failure and tissue ischemia, modified immune/inflammatory cells could be mobilized after implantation. Modification of local infiltration on top of fibrin deposit could increase the risk of the hybrid membrane after human implantation. Since this phenomenon is difficult to test in large animals after A-TAH implantation, the aim of the study was to identify the distribution and phenotype of inflammatory cells and inflammatory cytokines in nine patients after A-TAH implantation.

Material and Methods

Aeson Bioprosthetic Total Artificial Heart Study Design, Population and Sampling

Samples from nine patients in the A-TAH CE Mark clinical trial (Identifier: NCT02962973) and patients implanted in the

From the[†]Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Paris, France; [‡]Hematology and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, France; [§]Carmat SA, Vélizy-Villacoublay, France; [¶]Institut Curie, Paris, France; ^{||}Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Paris, France; ^{||}Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic; ^{**}Université de Paris, PARCC, INSERM and Emergency department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France; ^{**}National Research Cardiac Surgery Center, Nur-Sultan (Astana), Kazakhstan; ^{††}Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Paris, France; and ^{††}Cardiac Surgery Department, AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France.

Submitted for consideration December 2021; accepted for publication in revised form August 2022.

D.M.S., P.I., Y.P. and I.N. received consulting fees from CARMAT. C.P., C.L., A.C. and P.J. are employed by CARMAT-SAS. Other authors have no conflicts of interest to report.

This work was supported by grants of Carmat and PROMEX STIFTUNG FÜR DIE FORSCHUNG Foundation.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text, and links to the digital files are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.asaiojournal.com).

Correspondence: David M. Smadja, PhD, Hematology department, European Georges Pompidou hospital, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France. E-mail: david.smadja@aphp.fr; Twitter: @davidmsmadja.

Copyright © ASAIO 2022

DOI: 10.1097/MAT.0000000000001820

Georges Pompidou European Hospital with the Heartmate 3 (HM3) LVADs (authorization protocol number: 1922081) were included in this study. For A-TAH patients, all patients were classified in the Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support 3 or 4 (Table 1). Blood samples were collected on EDTA for peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) and 0.129 M trisodium citrate tubes (9NC BD Vacutainer, Plymouth, UK) for platelet-poor plasma (PPP). PPP was obtained after centrifugation twice at 2500g for 15 minutes. PPP was frozen and stored at -80°C until analysis. Blood samples for PPP were collected once a week during Intensive care unit, once a month during the first 6 months after implantation, and every 3 months after 6 months. Peripheral blood mononuclear cells of four patients with A-TAH were isolated and were collected once a month during the follow-up. Peripheral blood mononuclear cells of five patients with HM3 (median age: 62 years) were isolated and collected once during the follow-up with a median of 10 (4–43) months after implantation. Support duration goes from 1.5 months to 20 months in this study.

Inflammatory Cytokine Analysis

Cytokines in PPP were measured using a Human Magnetic Luminescence Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN). Data were assessed with the Bio-Plex 200 using the Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). In terms of sample number, we have in this cytokine study 55 samples after implantation.

Spectral Flow Cytometry

Briefly, PB-MNCs samples from patients were slowly thawed and resuspended in PBS-10% FBS-2mM EDTA buffer for counting in the first step and resuspended at a concentration of 10 million cells per mL. Staining was performed for 30 minutes with an antihuman antibodies cocktail of αCD45 , αCD19 , αCD3 , αCD5 , αCD4 , αCD8 , αCD56 , αCD11b , αCD11c , αCD14 , αCD16 , αCD34 , αKDR , αCD144 , and Zombie NIR (Biolegend) for viability for 30 minutes in the dark. Cells were washed twice to remove the antibodies excess. Before the acquisition, cells were fixed for 45 minutes in the dark at 4°C . Acquisitions were performed on an Aurora spectral flow cytometer (Cytex). Unmixing was then calculated and applied to samples based on reference single stained PB-MNCs. Data were analyzed in a supervised way (*i.e.*, manual gating) with FlowJo (FlowJo, LLC) and led to the identification of nine major immune sub-populations. Those supervised clusters of cells are displayed using Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) consisting in the concatenation of 10,000

downsampled live CD45+ cells per time point¹⁴. Data visualization was performed using the cloud-based platform OMIQ (<https://www.omiq.ai/>). Based on their respective expression of CD3 and CD56, four populations were identified as previously described¹⁵, that is, CD3⁺ CD56⁺ (Natural killer (NK) T cells), CD3⁺CD56⁻ (T cells), CD3⁻CD56⁻, and CD3⁻CD56⁺ (NK cells)¹⁵. Then, CD3⁺CD56⁻ were divided into two populations according to the expression of CD4 (CD4⁺ T cells) and CD8 (CD8⁺ T cells). Based on the expression of CD16 and the CD56 level, NK cells were subdivided in three subpopulations according to their maturation stages represented by CD16⁺ expression. The double negative subpopulation CD3⁻CD56⁻ was divided into four subpopulations according to the expression of CD14 and CD16, which allowed us to define the different types of monocytes (classical, intermediate, and nonclassical monocytes). Finally, the double negative subpopulation of this gate that is, CD3⁻CD56⁻CD14⁻CD16⁻ was divided in two subpopulations according to CD19 expression. The CD19⁻ subpopulation was divided between CD11b and CD11c expression and finally defined as circulating dendritic cells. CD19⁺ were defined as B cells.

Statistical Analysis

Continuous data were expressed as the mean of cells \pm standard error (SD). To evaluate changes over time we performed a linear mixed effect model separately for each biological test including the value of biomarkers as a dependent variable, the period of time as continuous explanatory variables, and the patient as random effect. To check for assumptions, we used residual plots for each linear mixed-effects model. We compared the mean value of each biomarker before and after A-TAH implantation using the Mann–Whitney U test or Kruskal–Wallis test and also by using two one side *t*-test (TOST) Welch's *t*-test to determine whether the means are equivalent. All analyses were two-sided, and a *p*-value was considered statistically significant for $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using R studio software including R version 3.6.3 (RStudio. Inc. Boston, MA) and GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Results

Aeson Bioprosthetic Total Artificial Heart do not Modify Inflammation Cytokines After Implantation

We explored inflammatory cytokine/markers after A-TAH implantation. First, using a non-parametric statistical method, we demonstrated an absence of significant change in the levels

Table 1. Clinical Characteristics of Patients Included in Pivotal Study for Aeson Total Artificial Heart implantation

Patients	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Age (year)	68	60	68	66	35	57	54	70	43
Gender	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male
BSA (m ²)	2	1.96	1.93	2.13	2.2	1.89	2	2.06	2.36
Cardiac index (L/min/m ²)	2	2.15	1.76	1.24	1.34	1.66	1.74	1.6	1.65
Intermacs class	3	3	3	4	3	3	2	3	3
Indication	DT	BTT	DT	DT	BTT	BTT	BTT	DT	BTT
Support duration (months)	1.5	8.1	9	20	5.1	10	3.6	9	10.2

BSA, body surface area; BTT, bridge to transplantation; DT, destination therapy.

of immune/inflammatory cytokines before and after A-TAH implantation (all $p > 0.05$; see Table 1, Supplemental Digital content 1, <http://links.lww.com/ASAIO/A867>). Moreover, we demonstrated the absence of statistical significance during follow-up with a linear mixed model separately for each biological test including the value of biomarkers as a dependent variable, the period of time as a continuous explanatory variable, and the patient as random effect (all $p > 0.05$; Table 1, Supplemental Digital content 1, <http://links.lww.com/ASAIO/A867>). Thus, both analyses suggested the same conclusion and were consistent with the absence of inflammatory signals. Finally, to provide support for the absence of a meaningful difference of inflammatory signals before and after A-TAH implantation, we performed a TOST equivalence test (Welch's t -test) using the standard deviation of the mean from the healthy volunteers' cohort. We observed similar results for most of the biomarkers (see Table 1, Supplemental Digital content 1, <http://links.lww.com/ASAIO/A867>).

A-TAH does not modify circulating Immune/hematopoietic cell populations after implantation.

First, leukocyte counts were not found to be significantly modulated according to time after A-TAH implantation (data not shown, $p = 0.44$). Subsequently, using spectral cytometry on PB-MNCs, and with a supervised analysis, we identified nine major immune populations based on their different phenotype considering their level of CD3, CD56, CD4, CD8, CD19, CD14, CD16, and CD11c. The resulting clusters are visualized on a UMAP plot in Figure 1 showing all single cells of 10,000 live CD45⁺ selected from down-sampled files concatenated at T0, T1, and T2. Regardless of the population explored, we did not find any significant modification during the follow-up as illustrated in Table 2, Supplemental Digital content 1, <http://links.lww.com/ASAIO/A867>. To confirm the relevance of our results we added a control group of three healthy volunteers (median age 35 years) and did not find any significant difference in the level of studied populations with the patient before and after A-TAH implantation (see Table 2, Supplemental Digital content 1, <http://links.lww.com/ASAIO/A867>). Finally, to increase the reliability of the data, we added a control LVAD group for spectral flow cytometry analysis. Indeed, PB-MNCs of five patients with HM3 (median age: 62 years) were isolated and collected once during the follow-up with a median of 10 (4–43) months after implantation. None of them had right ventricular failure. One of the patient had a driveline infection 1 month before exploration treated with antibiotics without any signs of systemic infection. We found that HM3 have increased levels of monocytes (classical and intermediate monocytes) in contrast to A-TAH in line with persistent inflammation after LVAD implantation in contrast to post-implantation levels in A-TAH (Figure 1).

Discussion

In the present study, we investigated whether the use of A-TAH could modulate inflammation during a pivotal study. Elevation in inflammation markers after LVAD has been correlated to mortality⁴. To investigate inflammation after A-TAH implantation, we analyzed inflammatory cell populations and cytokines for a period of 12 months after A-TAH implantation. Our analysis showed no significant differences in inflammatory circulating parameters among subjects after A-TAH.

We previously described an absence of evidence of relevant human leukocyte antigen antibodies development in a longitudinal follow-up after A-TAH implantation¹⁶. The absence of T-cell modulation combined with the absence of B-cell reactivity could explain the absence of the production of antibodies against human leukocyte antigen (HLA) molecules after A-TAH. In the pathways tested here, we observed absence of increase in Granzyme B and CD8⁺ T cells. CD8⁺ T cells have been described as involved in sterile chronic low-grade inflammation or recently in pathogenic response to acute Myocardial infarction injury⁷. Granzyme B has been previously identified as a major toxic protein in autoimmune and cardiovascular disorders but also has been associated with acute rejection after transplantation¹⁷. Absence of cytotoxic parameters increase confirms the relevance of hemocompatible tissues in contact with blood—that is, e-polytetrafluoroethylene and hybrid membrane in bovine pericardial tissue—and the safety of pericardial tissue used for hybrid membrane as previously demonstrated¹¹. The A-TAH has been developed to minimize drawbacks of current mechanical assist devices and in particular LVAD. Inflammation is part of all hemocompatibility-associated complications, such as thrombosis, bleeding complications, and major infection. Thus, controlling inflammation after the A-TAH implantation process could limit thrombosis, bleeding risk, and infections.

First, regarding infection risk and inflammation-related disorders; our results demonstrate an absence of progressive defects in cellular immunity in contrast to what has been described after LVAD implantation¹⁸. Indeed, these defects predispose LVAD recipients to systemic infections¹⁹. Driveline infections in LVAD remain one of the most common adverse events at the origin of complications^{20,21}. Absence of immunity perturbation after A-TAH implantation could explain at least in part the absence of driveline infection in A-TAH. Moreover, shear stress has been described to be involved in the development of bacterial infections at the sites of cardiovascular device implantation²². Shear stress induces apoptosis of neutrophils and or monocytes^{22,23}. We previously demonstrated that A-TAH does not induce any hemolysis or acquired von Willebrand syndrome, both related disorders attributed to increased shear stress^{12,24–26}. The absence of significant shear stress in A-TAH implantation could also explain at least in part the absence of myeloid cells increase with markers of activation and so absence of driveline infection in A-TAH in contrast to LVAD.

Second, regarding thrombosis risk and inflammation-related disorders, the interplay between blood coagulation and inflammation is a well-known mechanism. Indeed, arterial but also venous thrombosis are both related to thrombo-inflammation. In fact, endothelial activation associated with inflammation turned out to be a major determinant mediating cerebral ischemia/reperfusion injury²⁷ or COVID-19 microthrombosis²⁸. Chronic inflammatory with high levels of cytokines in subjects with LVAD has been correlated to the worsening of endothelial function²⁹. These observations have been recently confirmed in subjects with LVADs, comparing them with subjects with chronic heart failure with reduced ejection fraction on the list for a heart transplant (HT) and with HT patients with normal systolic cardiac function³⁰. In this cohort, inflammation evaluated with C-reactive protein was the only factor able to influence endothelial function in patients with LVAD, reinforcing links between inflammation and endothelial function³⁰. According

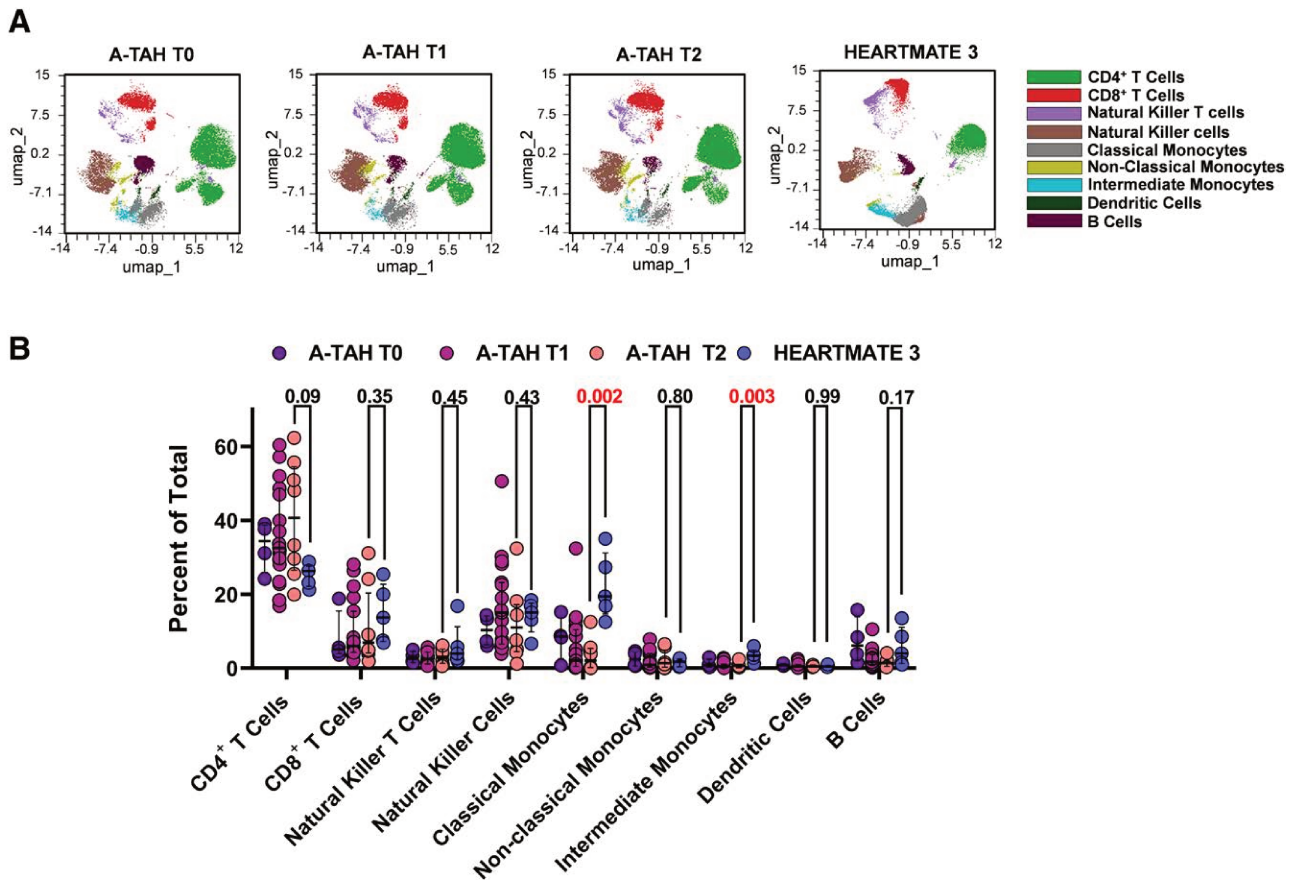


Figure 1. Immune/hematopoietic populations quantified by spectral flow cytometry after A-TAH and Heartmate 3 implantation. A: Immune/hematopoietic populations visualized with UMAP per time point, *i.e.* Concatenated before A-TAH implantation (T0), before 3 months following A-TAH implantation (T1) and after 3 months following A-TAH implantation (T2). Results are compared with data from five patients implanted with Heartmate 3 (median age: 62 y; median time [range] from implantation: 10 [4–43] months). B: Quantification of immune populations visualized in (A).

A-TAH, Aeson total artificial heart; T0, peripheral blood mononuclear cells collection before A-TAH implantation; T1, peripheral blood mononuclear cells collection after three months; T2, peripheral blood mononuclear cells collection after three months of implantation; UMAP, Uniform Manifold Approximation and Projection.

to these hypotheses, the absence of a pro-inflammatory signal after A-TAH implantation is in line with our previous results describing the absence of endothelial activation after A-TAH in automatic mode³¹. Other prothrombotic consequences of inflammation are related to neutrophils activation and neutrophils extracellular traps³² and tissue factor expressing extracellular vesicles³³. Following A-TAH, we previously described the absence of increase of the most prothrombotic extracellular vesicles (platelet extracellular vesicles)¹¹. One of the limitations of our study in terms of thromboinflammation control is the absence of Neutrophil extracellular traps (NETs) quantification after A-TAH implantation. However, in feasibility as well as pivotal study, we never observed any thrombotic event confirming the safety of the device in line with the absence of thromboinflammatory process after implantation.

Finally, regarding bleeding risk and inflammation-related disorders, A-TAH seems to prevent all classic origin of hemorrhage. Anemia is present in the most common etiology of bleeding after LVAD implantation³⁴. Chronic anemia is one of the markers associated with worse outcomes after LVAD compared to nonanemic patients³⁵. Chronic inflammation induced anemia by several mechanisms: first, modification of iron

trafficking by interfering with dependent and independent hepcidin mechanism; second decreased erythropoiesis mainly by reduced production and/or reduced biological activity of erythropoietin; and third a decreased erythrocyte survival³⁶. Anemia regardless of etiology is associated with adverse outcomes after LVAD implantation³⁵. Whatever mechanism is involved in inflammation-related anemia, all are secondary to multiple cytokines (*e.g.*, interleukin-1 β , IL-6, IL-10, and interferon- γ). All these cytokines are not modulated by A-TAH implantation. The absence of anemia related to inflammation added to the absence of hemolysis and acquired von Willebrand syndrome^{12,26} are all a mark of safety against the bleeding process in contrast to LVAD.

Finally, the major cause of bleeding during LVAD support is gastrointestinal bleeding associated with angiodysplasia, an angiogenesis-related signal cascade. It has been recently described that increased tumor necrosis factor (TNF)- α levels in LVAD patients are a central regulator of altered angiogenesis with facilitation of pericytes apoptosis, reduction of the expression of angiopoietin-1, increase in tissue factor expression, and destabilization of endothelial cells³⁷. Relevance of plasma TNF- α levels and bleeding rates have been confirmed

in a subanalysis of the PREVENT biobank study³⁸. Thus, the absence of TNF- α increase after A-TAH implantation is probably a protective factor against angiodysplasia. Our study have major limitations, and one of the most important is the small sample size and the risk of type II error, we used various nonparametric statistical methods. All analyses pointed to the same observation and were consistent with the absence of inflammatory signals after A-TAH implantation.

All in all, we have demonstrated that A-TAH implantation seems to be safe according to proinflammatory signal. The absence of regulation of inflammatory cytokines is helpful to avoid increased risks of cardiovascular events independently of A-TAH implantation.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge all nurses, technicians and physicians involved in cardiac Surgery department involved in A-TAH implantation.

References

- Ankersmit HJ, Tugulea S, Spanier T, et al: Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist device. *Lancet* 354: 550–555, 1999.
- Deng MC, Erren M, Tjan TD, et al: Left ventricular assist system support is associated with persistent inflammation and temporary immunosuppression. *Thorac Cardiovasc Surg* 47(suppl 2): 326–331, 1999.
- Granja T, Magunia H, Schussel P, Fischer C, Pruffer T, Schibilsky D, et al: Left ventricular assist device implantation causes platelet dysfunction and proinflammatory platelet-neutrophil interaction. *Platelets* 33: 132–140, 2022.
- Sciacaluga C, Ghionzoli N, Mandoli GE, et al: Biomarkers in patients with left ventricular assist device: An insight on current evidence. *Biomolecules* 12: 334, 2022.
- Woolley JR, Teuteberg JJ, Bermudez CA, et al: Temporal leukocyte numbers and granulocyte activation in pulsatile and rotary ventricular assist device patients. *Artif Organs* 38: 447–455, 2014.
- Ait-Oufella H, Libby P, Tedgui A: Anticytokine immune therapy and atherothrombotic cardiovascular risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 39: 1510–1519, 2019.
- Santos-Zas I, Lemarié J, Zlatanova I, et al: Cytotoxic CD8+ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. *Nat Commun* 12: 1483, 2021.
- Han JJ: Aeson-The Carmat total artificial heart is approved for enrollment in the United States. *Artif Organs* 45: 445–446, 2021.
- Poitier B, Chocron R, Peronino C, et al: Bioprosthetic total artificial heart in autoregulated mode is biologically hemocompatible: Insights for multimers of von willebrand factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 42: 470–480, 2022.
- Nascimbene A, Dong JF: Hydrodynamic impact on blood: From left ventricular assist devices to artificial hearts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 42: 481–483, 2022.
- Richez U, De Castilla H, Guerin CL, et al: Hemocompatibility and safety of the carmat total artificial heart hybrid membrane. *Heliyon* 5: e02914, 2019.
- Smadja DM, Saubaméa B, Susen S, et al: Bioprosthetic total artificial heart induces a profile of acquired hemocompatibility with membranes recellularization. *J Am Coll Cardiol* 70: 404–406, 2017.
- Carpentier A: Lasker clinical research award. the surprising rise of nonthrombogenic valvular surgery. *Nat Med* 13: 1165–1168, 2007.
- Becht E, McInnes L, Healy J, Dutertre CA, Kwok IWH, Ng LG, et al: Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nat Biotechnol.* 37: 38–44, 2019.
- Guerin CL, Guyonnet L, Goudot G, et al: Multidimensional proteomic approach of endothelial progenitors demonstrate expression of KDR restricted to CD19 cells. *Stem Cell Rev Rep* 17: 639–651, 2021.
- Netuka I, Pya Y, Bekbossynova M, et al: Initial bridge to transplant experience with a bioprosthetic autoregulated artificial heart. *J Heart Lung Transplant* 39: 1491–1493, 2020.
- Soccal PM, Doyle RL, Jani A, et al: Quantification of cytotoxic T-cell gene transcripts in human lung transplantation. *Transplantation* 69: 1923–1927, 2000.
- Kimball PM, Flattery M, McDougan F, Kasirajan V: Cellular immunity impaired among patients on left ventricular assist device for 6 months. *Ann Thorac Surg* 85: 1656–1661, 2008.
- Aburjania N, Hay CM, Sohail MR: Continuous-flow left ventricular assist device systems infections: Current outcomes and management strategies. *Ann Cardiothorac Surg* 10: 233–239, 2021.
- Leuck AM: Left ventricular assist device driveline infections: Recent advances and future goals. *J Thorac Dis* 7: 2151–2157, 2015.
- Juraszek A, Smólski M, Kolsut P, et al: Prevalence and management of driveline infections in mechanical circulatory support - a single center analysis. *J Cardiothorac Surg* 16: 216, 2021.
- Shive MS, Salloum ML, Anderson JM: Shear stress-induced apoptosis of adherent neutrophils: A mechanism for persistence of cardiovascular device infections. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6710–6715, 2000.
- Shive MS, Brodbeck WG, Colton E, Anderson JM: Shear stress and material surface effects on adherent human monocyte apoptosis. *J Biomed Mater Res* 60: 148–158, 2002.
- Carpentier A, Latrémouille C, Cholley B, et al: First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: Report of two cases. *Lancet* 386: 1556–1563, 2015.
- Latrémouille C, Carpentier A, LePrince P, et al: A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *J Heart Lung Transplant* 37: 33–37, 2018.
- Smadja DM, Susen S, Rauch A, et al: The carmat bioprosthetic total artificial heart is associated with early hemostatic recovery and no acquired von willebrand syndrome in calves. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 31: 1595–1602, 2017.
- Dhanesha N, Prakash P, Doddapattar P, et al: Endothelial cell-derived von willebrand factor is the major determinant that mediates von willebrand factor-dependent acute ischemic stroke by promoting postischemic thromboinflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 36: 1829–1837, 2016.
- Smadja DM, Mentzer SJ, Fontenay M, et al: COVID-19 is a systemic vascular hemopathy: Insight for mechanistic and clinical aspects. *Angiogenesis* 24: 755–788, 2021.
- Watanabe A, Amiya E, Hatano M, et al: Significant impact of left ventricular assist device models on the value of flow-mediated dilation: Effects of LVAD on endothelial function. *Heart Vessels* 35: 207–213, 2020.
- Cortese F, Ciccone MM, Gesualdo M, et al: Continuous flow left ventricular assist devices do not worsen endothelial function in subjects with chronic heart failure: A pilot study. *ESC Heart Fail* 8: 3587–3593, 2021.
- Smadja DM, Chocron R, Rossi E, et al: Autoregulation of pulsatile bioprosthetic total artificial heart is involved in endothelial homeostasis preservation. *Thromb Haemost* 120: 1313–1322, 2020.
- d'Alessandro E, Becker C, Bergmeier W, et al; Scientific Reviewer Committee: Thrombo-inflammation in cardiovascular disease: An expert consensus document from the third maastricht consensus conference on thrombosis. *Thromb Haemost* 120: 538–564, 2020.
- Date K, Ettelaie C, Maraveyas A: Tissue factor-bearing microparticles and inflammation: A potential mechanism for the development of venous thromboembolism in cancer. *J Thromb Haemost* 15: 2289–2299, 2017.
- Carlson LA, Maynes EJ, Choi JH, et al: Characteristics and outcomes of gastrointestinal bleeding in patients with continuous-flow left

- ventricular assist devices: A systematic review. *Artif Organs* 44: 1150–1161, 2020.
35. Amione-Guerra J, Cruz-Solbes AS, Bhimaraj A, *et al*: Anemia after continuous-flow left ventricular assist device implantation: Characteristics and implications. *Int J Artif Organs* 40: 481–488, 2017.
36. Weiss G, Ganz T, Goodnough LT: Anemia of inflammation. *Blood* 133: 40–50, 2019.
37. Tabit CE, Coplan MJ, Chen P, Jeevanandam V, Uriel N, Liao JK: Tumor necrosis factor- α levels and non-surgical bleeding in continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* 37: 107–115, 2018.
38. Kim GH, Sayer G, Ransom J, Keebler M, Katz J, Kilic A, *et al*: Increased bleeding risk in LVAD patients with elevated angiotensin-2 and TNF- α : Analysis of the PREVENT multicenter study. *J Heart Lung Transplant* 37:S71, 2018.

Supplementary Table 1: Proinflammatory markers were measured in patient blood samples before (baseline), and after 1 to 12 months after A-TAH implantation. Coefficient and p-value of the linear mixed effect model. 95% CI= 95% confident intervals. TOST = Two One Side Test; A-TAH: Aeson® total artificial heart

	Before A-TAH implantation		After A-TAH implantation		Mann-Whitney U test: before vs after implantation (p-value)	Linear mixed model according to period		TOST Welch's t-test (p-value)	
	mean	SD	mean	SD		Coefficient Value [95% CI]	p-value		
CD40 ligand	2973,77	1675,17	3196,79	2924,58	0,825	-350.63 [-1036.90-335.64]	0,158	0,311	-
EGF	105,86	74,73	105,86	146,86	1	-19.93 [-49.33-9.47]	0,092	0,032	Equivalent
Eotaxin	217,64	67,39	205,59	70,52	0,634	-4.69 [-26.03-16.65]	0,333	0,023	Equivalent
FLT3 ligand	126,77	36,27	146,93	53,93	0,284	3.07 [-10.62-16.75]	0,33	0,013	Equivalent
Fractalkine	886,35	304,25	1033,08	939,22	0,646	-4.74 [-299.65-290.17]	0,487	0,205	-
G-CSF	54,34	30,59	39,65	45,28	0,353	-6.26 [-21.32-8.79]	0,207	0,102	-
GM-CSF	24,36	18,96	29,94	32,48	0,619	1.26 [-9.19-11.71]	0,407	0,028	Equivalent

GranzymeB	13,69	5,68	19,81	39,53	0,646	5.53 [-7.31-18.36]	0,199	0,521	-
GRO-α	128,24	166,75	112,56	127	0,743	-14.72 [-54.90-25.46]	0,236	0,161	-
GRO-β	839,73	391,18	927,18	609,16	0,679	-1.67 [-174.73-171.40]	0,492	0,122	-
IFN-α	12,26	7,81	10,32	7,67	0,486	-0.30 [-2.78-2.17]	0,404	0,039	Equivalent
IFN-β	0,96	2,7	0,41	1,55	0,377	-0.16 [-0.67-0.35]	0,265	0,006	Equivalent
IFN-γ	6,83	3,12	7,28	4,16	0,757	-0.30 [-1.40-0.80]	0,298	0,044	Equivalent
IL-1α	20,04	8,76	19,53	7,38	0,85	-0.72 [-2.93-1.48]	0,259	0,015	Equivalent
IL-1β	3,24	2,8	4,62	3,29	0,239	0.15 [-0.86-1.16]	0,389	0,008	Equivalent
IL1RA	845,15	485,47	852,78	837,8	0,979	-159.77 [-438.65-119.10]	0,131	0,033	Equivalent
IL-2	3,87	1,18	3,69	0,93	0,597	-0.11 [-0.41-0.18]	0,226	0,015	Equivalent
IL-3	8,17	8,05	7,6	7,97	0,843	-1.99 [-4.30-0.32]	0,066	0,013	Equivalent
IL-4	2,58	2,32	2,4	2,94	0,861	0.06 [-0.68-0.80]	0,438	0,019	Equivalent
IL-5	7,64	4,12	6,88	2,79	0,479	-0.62 [-1.46-0.21]	0,072	0,013	Equivalent
IL-6	46,12	38,9	60,02	70,17	0,565	6.20 [-17.23-29.63]	0,302	0,686	-
IL-7	7,57	3,67	8,32	6,44	0,735	-0.51 [-1.79-0.76]	0,215	0,421	-
IL-8	10,6	9,56	13,04	14,93	0,638	1.71 [-3.11-6.52]	0,244	0,611	-
IL-10	146,37	76,21	268,83	853,53	0,671	129.09 [-148.73-406.91]	0,181	0,629	-
IL-12p70	5,74	6,24	5,2	8,05	0,85	-1.60 [-3.62-	0,061	0,001	Equivalent

						0.42]			
IL-13	61,74	14,46	63,58	16,24	0,75	-0.03 [-4.51-4.45]	0,495	0,044	Equivalent
IL-15	2,3	1,16	1,97	1,42	0,51	-0.26 [-0.69-0.17]	0,116	0,249	-
IL-17E	25,98	70,48	11,19	33,2	0,304	8.72 [-22.31-4.88]	0,104	0,823	-
IL-33	8,31	8,38	13,22	15	0,343	0.01 [-4.71-4.72]	0,499	0,481	-
IP-10	181,4	99,13	445,08	1171,67	0,505	172.67 [-209.52-554.87]	0,188	0,671	-
MCP-1	263,16	63,61	340,22	413,92	0,582	63.92 [-69.38-197.22]	0,174	0,579	-
MIP-1α	42	8,54	49,26	17,71	0,234	4.22 [-1.50-9.93]	0,074	0,103	-
MIP-1β	273,29	55,15	316,4	201,99	0,529	31.76 [-32.92-96.44]	0,168	0,481	-
MIP-3α	45,43	22,44	74,99	85,98	0,312	6.83 [-20.90-34.55]	0,315	0,778	-
MIP-3β	425,12	550,1	495,99	447,15	0,67	32.73 [-82.87-148.33]	0,289	0,263	-
PDL1-B7H1	114,49	30,36	132,86	64,19	0,404	6.99 [-13.53-27.50]	0,252	0,022	Equivalent
RANTES	89264,53	44749,27	87930,03	44727,42	0,934	-6548.94 [-21268.12-8170.24]	0,192	0,019	Equivalent
TNF-α	17,81	5,53	19,94	6,66	0,365	0.12 [-1.89-2.13]	0,454	0,049	Equivalent
TRAIL	37,29	26,55	36,57	19,29	0,921	-3.93 [-10.05-2.18]	0,104	0,026	Equivalent

Supplementary Table 2: Immune/hematopoietic cells populations count per million of live CD45+; the results are shown by mean of cells x10³ according to period (before A-TAH implantation, after A-TAH implantation and before 3 month of follow-up and over 3 month of follow-up.

A-TAH: Aeson® total artificial heart

Population (cells x10 ³ per million of live CD45 ⁺)	Healthy controls		Before A-TAH implantation		After A-TAH implantation < Month 3		After A-TAH implantation > Month 3		Kruskal Wallis test: before vs after A-TAH implantation (p-value)	Mann-Whitney U test: before A-TAH implantation vs healthy controls (p-value)	Mann-Whitney U test: after A-TAH implantation vs healthy controls (p-value)
	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD			
T4 lymphocytes (CD3 ⁺ CD56 ⁻ CD4 ⁺)	335	142	370	50	404	30	448	56	0.76	0.71	0.33
T8 lymphocytes (CD3 ⁺ CD56 ⁻ CD8 ⁺)	190	27	200	80	212	36	232	70	0.90	0.91	0.77
B lymphocytes (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD14 ⁻ CD16 ⁻ CD19 ⁺)	79	32	87	37	47	9	21	5	0.051	0.86	0.07
Monocytes (CD3 ⁻ CD56 ⁻)	494	229	1955	763	1503	454	1253	401	0.59	0.17	0.24
Classical	216	192	82	33	62	18	41	17	0.45	0.92	0.77

monocytes (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD14 ⁺ CD16 ⁻)												
Non-classical monocytes (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD14 ⁻ CD16 ⁺)	200	73	366	182	199	54	363	167	0.54	0.17	0.43	
Intermediate monocytes (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD14 ⁺ CD16 ⁺)	12	11	10	6	7	2	6	2	0.62	0.92	0.31	
Dendritic cells (CD3 ⁻ CD56 ⁻ CD14 ⁻ CD16 ⁻ CD11c ⁺)	12	2.3	23	15	25	12	5	0.7	0.65	0.55	0.75	
NK cells (CD3 ⁻ CD56 ⁺)	74	9.8	121	34	176	30	133	35	0.67	0.29	0.21	
NK cells 56^{dim} CD16⁺ (CD3 ⁻ CD56 ^{+dim} CD16 ⁺)	61	11	91	23	153	27	113	32	0.56	0.33	0.23	
NK cells 56^{dim} CD16⁻ (CD3 ⁻ - CD56 ^{+dim} CD16 ⁻)	2.2	1.5	7.9	3.6	6.9	2	7.3	2.9	0.70	0.23	0.34	
NK cells 56^{high} CD16⁻ (CD3 ⁻ CD56 ^{high} CD16 ⁻)	4.8	0.7	3.8	0.92	3.6	0.68	3.7	0.6	0.69	0.41	0.43	

Discussion

Le cœur artificiel total Aeson de Carmat est un dispositif d'assistance circulatoire à flux pulsatile composé de matériaux hémocompatibles et bioprothétique avec une membrane hybride composée de péricarde bovin prétraité au glutaraldéhyde collé à du polyuréthane. Ce travail de thèse s'est intéressé à 3 points importants participants à l'hémocompatibilité des biomatériaux ou assistances circulatoires : l'hémolyse, les anomalies du facteur Willebrand ou encore le potentiel syndrome inflammatoire chronique.

4.1. Les multimères de facteur von Willebrand

L'analyse du multimères de VWF est une analyse permettant de quantifier les potentielles altérations dues au shear stress. Un des principaux problèmes avec cette technique d'analyse des multimères par électrophorèse est le manque de standardisation. Les différents types de multimères dans le plasma que l'on peut retrouver sont les multimères de bas poids moléculaire (LMWM), multimères de poids moléculaire intermédiaire (IMWM) et multimères de haut poids moléculaire (HMWM) voir de très haut poids moléculaire. Pour répondre à ces problématiques, nous avons d'abord choisi de standardiser la technique commercialisée par la société Sébia, ce qui nous a permis notamment d'ajuster les dépôts pour les analyses de multimères à un VWF :Ag de 100% comme ce qui a déjà été fait dans la littérature²⁷³ pour les taux supérieurs à 100%. Nous avons commencé à établir nos premiers seuils de normalité avec un pool de plasma dit « maison » et nous avons observé les mêmes tendances des coefficients de variations (CV) que l'équipe de Pikta²⁷⁴, à savoir que les LMWM et les HMWM ont des CV plus élevés que celui des IMWM : Pikta et son équipe dans leur test intergel ont des CV à 16,6% pour les LMWM, 6,2% pour les IMWM, et 8,1% pour les HMWM et nous avons obtenu par nos tests intergel : 9,61 % pour les LMWM ; 7,05 % pour les IMWM et 11,05 % pour les HMWM avec le plasma « maison ». Néanmoins, pour pouvoir atteindre le niveau requis pour accréditer la méthode, il était nécessaire d'utiliser un contrôle standardisé et le plasma Cryocheck™ semble pouvoir répondre à cela. Ces CV sont proches de ce que nous avons observé pour le plasma « maison » : 8,4% pour les LMWM ;

5,2% pour les IMWM ; 12,0 % pour les HMWM, mais il est nécessaire d'obtenir plus de valeurs pour renforcer les premières analyses et ainsi confirmer le remplacement du pool de plasma « maison » par ce plasma standardisé.

4.2. Le facteur von Willebrand en tant que biomarqueur

d'hémocompatibilité

Au cours de cette étude nous avons pu corroborer ce qui avait déjà été observé, c'est-à-dire une dégradation des VWF pour les patients implantés avec un LVAD HMII et HM3^{222,276,277}. Dans le cas des HM3, les patients développent néanmoins une perte moins forte des VWF en comparaison des HMII²⁷⁷ et cela peut s'expliquer par le flux pseudo-pulsatile généré par le moteur centrifuge par la modulation de la vitesse du flux continu. De plus les forces de cisaillements moins fortes générées par le moteur centrifuge de HM3 permettent de réduire la perte des multimères de VWF de haut poids moléculaire, ce qu'on a pu observer dans l'étude. De plus, nous avons pu observer qu'il y avait un lien entre l'indice de pulsativité et la perte des VWF HMWM comme il a été proposé dans l'étude de Yang et al.²⁷⁹

après implantation du cœur Aeson, nous savons pu montrer que seulement 1.4% des prélèvements ont montré une augmentation de l'hémoglobine plasmatique (>20mg/dL) correspondant à la définition d'une hémolyse selon l'INTERMAC²⁸⁰, un des prélèvements avait les hémoglobines plasmatiques plus élevées suite à une réopération qui se sont normalisée le jour suivant. Les 2 autres prélèvements se sont également normalisés le prélèvement suivant. Ces résultats confirment l'absence d'hémolyse significative durant le support avec A-TAH. Nous n'avons également observé aucune hémolyse malgré l'augmentation des forces de cisaillements après l'augmentation du débit cardiaque, ce qui est corrélé aux résultats déjà observés par les précédentes études in vivo⁴⁴. De même pour les résultats obtenus pour les patients de l'étude de faisabilité en mode manuel^{46,47} ne montrant aucun événement d'hémolyse ou de thrombose.

Après implantation du cœur Aeson, nous avons également pu observer une bonne préservation des HMWM de VWF durant le support. Ainsi le profil multimérique semble

similaire à ceux des donneurs sains et cela durant toute la durée de l'implantation, contrairement aux patients implantés avec HMII et HM3. Ce papier nous a montré que l'A-TAH en mode automatique n'induisait pas d'hémolyse ni de syndrome de Willebrand acquis. Cet article a également montré que le facteur Willebrand pouvait être modulé en fonction des forces de cisaillement généré par le débit cardiaque et le rythme cardiaque tout en restant dans les seuils physiologiques. En utilisant un modèle de simulation des forces dans la cavité ventriculaire du cœur Aeson, nous avons pu déterminer que le VWF était modifié dans le modèle si les forces de cisaillements dépassent les 17.5 Pa, mais malgré les différents débits cardiaques utilisés pour les mesures, le pourcentage de volume sanguin affecté par les forces élevées de cisaillements est toujours inférieur à 0.03% dans les deux ventricules.

4.3. Présence de marqueurs inflammatoires chez les patients implantés avec un cœur artificiel total Aeson

Au cours de cette étude, l'objectif était de vérifier si le TAH Aeson modulait l'inflammation après son implantation, comme il a été observé pour les patients implantés avec des LVADs¹³⁶. Dans une étude préalablement réalisée par Netuka et al.²⁸², l'absence d'hyperimmunisation anti-HLA (Human Leukocyte Antigen/CMH). Notre étude ici nous montre l'absence d'inflammation chronique post implantation Aeson avec notamment une absence de modulation des taux de lymphocytes T et de lymphocytes B. Dans notre étude, nous n'avons pas observé qu'une absence d'augmentation de lymphocytes T (LT) cytotoxiques (CD8+) corroborés par l'absence d'augmentation de granzyme B. Granzyme B est une protéine toxique majeure dans les troubles auto-immuns et cardiovasculaires, mais également dans le rejet d'organe après transplantation²⁸⁵. Nos autres résultats suggèrent le maintien des cellules immunitaires, sans modulation des cellules immunes et ce durant toute la durée de l'implantation (de 0 à plus de 6 mois), contrairement à ce qui a été observé dans d'autres études^{138,286} pour les patients implantés avec le dispositif LVAD où une inflammation chronique a été observée. Cet état d'inflammation chronique est connue pour provoquer plusieurs réactions, l'hyperactivation des RAAS^{137,138}, la défaillance multi-organes

postopératoire^{23,145,146} ou encore la thrombose¹⁴⁷ ou la survenue d'angiodyplasie. En effet, il a été montré que la hausse de TNF- α chez les patients LVAD est un régulateur central de l'angiogenèse et pourrait favoriser la survenue d'angiodyplasie et donc de saignements¹⁵⁵. L'infection chronique rend également l'hôte plus sensible à l'infection systémique à cause du déficit immunitaire engendré²⁸⁷ pouvant se caractériser notamment par l'infection du câble d'alimentation des LVAD²⁶⁸⁻²⁷⁰. Après implantation de Aeson, aucune infection de câble n'a été observée.

4.4. Discussion globale hémocompatibilité du TAH-Aeson

Les dispositifs d'assistance circulatoire mécaniques et en particulier les LVAD constituent un outil essentiel pour traiter l'insuffisance cardiaque avancée. La thrombose et les complications liées aux saignements ont été les deux principaux obstacles pour les patients nécessitant un MCS. L'amélioration de l'hémocompatibilité des nouvelles générations de VAD et surtout des cœurs artificiels contribuent à améliorer la qualité de vie des patients en réduisant les saignements et la thrombose. En effet, le cœur artificiel Aeson A-TAH est un dispositif entièrement bioprothétique offrant un bon degré d'hémocompatibilité, permettant un soutien cardiaque complet avec un faible régime antithrombotique et un faible risque thrombotique. Une meilleure compréhension de l'interaction entre la contrainte de cisaillement, les biomatériaux et les composants cellulaires et plasmatiques doit être prise en compte pour le développement de la prochaine génération d'assistance circulatoire mécanique. Un "passeport d'hémocompatibilité", comprenant une simulation/modélisation de la contrainte de cisaillement et des composants sanguins, peut être utilisé pour évaluer les paramètres d'hémostase dans les études de faisabilité, ainsi que dans les essais précliniques et cliniques de dispositifs.

En intégrant ces paramètres d'hémocompatibilité, un cœur artificiel ou un dispositif d'assistance circulatoire cardiaque peut offrir une solution sûre et efficace pour traiter l'insuffisance cardiaque avancée, améliorant la qualité de vie des patients et réduisant les risques associés à la circulation sanguine mécanique.

Perspectives

5.1. Perspectives cliniques Carmat

Une des perspectives de cette thèse est de continuer les analyses cliniques des différentes études en cours, il reste encore 3 patientes pour compléter l'étude Pivot, 7 patients à implanter pour l'étude de faisabilité des États-Unis et 49 patients pour finaliser l'étude EFICAS. Une des limitations de nos études est la faible taille du groupe de patients implantés avec le TAH Aeson. Une des possibilités est de confirmer les résultats préalablement obtenus et de les confirmer avec un groupe de patients plus conséquents.

5.2. Vers un dispositif hémocompatible

Un cœur artificiel ou un dispositif d'assistance circulatoire cardiaque se doit de présenter une gamme complète de paramètres d'hémocompatibilité pour assurer un fonctionnement optimal et sécurisé. Voici les éléments clés qui garantissent une hémocompatibilité optimale qui pourraient définir ce « passeport d'hémocompatibilité » :

1. **Éviter la Stase Sanguine** : Le dispositif doit être conçu de manière à minimiser la stase sanguine, c'est-à-dire la stagnation du flux sanguin, afin d'éviter la formation de caillots potentiellement dangereux.
2. **Matériaux/Surfaces Hémocompatibles** : Les matériaux et les surfaces en contact avec le sang doivent être soigneusement choisis pour minimiser les interactions négatives avec les composants sanguins et réduire les risques de thrombose.

3. **Absence d'Hémolyse** : Le dispositif ne doit pas provoquer de destruction excessive des globules rouges, évitant ainsi les problèmes d'anémie et de toxicité associés à l'hémolyse.
4. **Pas d'Activation Plaquettaire** : Le dispositif ne doit pas déclencher d'activation plaquettaire.
5. **Éviter l'État Hypercoagulable** : Le dispositif doit maintenir un état physiologique de coagulation.
6. **Prévention des Infections** : Le dispositif doit être conçu pour minimiser le risque d'infection, en évitant la formation de biofilms et la prolifération de bactéries.
7. **Réduire l'Inflammation Chronique** : Le dispositif ne doit pas déclencher de réponse inflammatoire chronique, ce qui pourrait endommager les tissus environnants.
8. **Maintenir la Fonction Microvasculaire** : Le dispositif ne doit pas interférer avec la fonction des petits vaisseaux sanguins, garantissant une perfusion adéquate des tissus.
9. **Éviter le Syndrome Acquis de von Willebrand** : Le dispositif ne doit pas induire un syndrome de von Willebrand acquis.
10. **Faible Régime Antithrombotique Requis** : Idéalement, le dispositif doit nécessiter un faible régime antithrombotique pour maintenir la coagulation adéquate, minimisant ainsi les risques de saignement excessif.

Références bibliographiques

1. Malik, A., Brito, D., Vaqar, S. & Chhabra, L. Congestive Heart Failure. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2023).
2. Tsao, C. W. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **147**, e93–e621 (2023).
3. Classes of Heart Failure. *www.heart.org* <https://www.heart.org/en/health-topics/heart-failure/what-is-heart-failure/classes-of-heart-failure>.
4. Heidenreich, P. A. *et al.* 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation* **145**, e895–e1032 (2022).
5. Murphy, S. P., Ibrahim, N. E. & Januzzi, J. L., Jr. Heart Failure With Reduced Ejection Fraction: A Review. *JAMA* **324**, 488–504 (2020).
6. Redfield, M. M. & Borlaug, B. A. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. *JAMA* **329**, 827–838 (2023).
7. Njoroge, J. N. & Teerlink, J. R. Pathophysiology and Therapeutic Approaches to Acute Decompensated Heart Failure. *Circ. Res.* **128**, 1468–1486 (2021).
8. Melendo-Viu, M. *et al.* Left Ventricular Assist Device as a Destination Therapy: Current Situation and the Importance of Patient Selection. *Life* **13**, 1065 (2023).
9. Theochari, C. A. *et al.* Heart transplantation versus left ventricular assist devices as destination therapy or bridge to transplantation for 1-year mortality: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **7**, 3–11 (2018).
10. Bayes-Genis, A. *et al.* Destination Therapy with Left Ventricular Assist Devices in Non-transplant Centres: The Time is Right. *Eur. Cardiol. Rev.* **15**, e19 (2020).

11. Liotta, D. *et al.* Prolonged assisted circulation during and after cardiac or aortic surgery: Prolonged partial left ventricular bypass by means of intracorporeal circulation. *Am. J. Cardiol.* **12**, 399–405 (1963).
12. Wiedemann, D. *et al.* Ventricular Assist Devices – Evolution of Surgical Heart Failure Treatment. *Eur. Cardiol. Rev.* **9**, 54–58 (2014).
13. Fox, A. A. & Fox, J. A. Ventricular assist devices. in *Essential Clinical Anesthesia* (eds. Vacanti, C., Sikka, P., Urman, R. & Segal, S.) 479–484 (Cambridge University Press, 2011).
doi:10.1017/CBO9780511842306.079.
14. McBride, L. R., Naunheim, K. S., Fiore, A. C., Moroney, D. A. & Swartz, M. T. Clinical experience with 111 thoratec ventricular assist devices. *Ann. Thorac. Surg.* **67**, 1233–1238 (1999).
15. Zimpfer, D. *et al.* Neurocognitive function in patients with ventricular assist devices: a comparison of pulsatile and continuous blood flow devices. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1992** **52**, 24–27 (2006).
16. Drews, T. *et al.* Differences in pulsatile and non-pulsatile mechanical circulatory support in long-term use. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **27**, 1096–1101 (2008).
17. Strueber, M. *et al.* Multicenter Evaluation of an Intrapericardial Left Ventricular Assist System. *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 1375–1382 (2011).
18. Kugler, C. *et al.* Health-related quality of life and exercise tolerance in recipients of heart transplants and left ventricular assist devices: a prospective, comparative study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **30**, 204–210 (2011).
19. Molina, E. J. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2020 Annual Report. *Ann. Thorac. Surg.* **111**, 778–792 (2021).
20. Yuzefpolskaya, M. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons Intermacs 2022 Annual Report: Focus on the 2018 Heart Transplant Allocation System. *Ann. Thorac. Surg.* **115**, 311–327 (2023).

21. Timms, D. A review of clinical ventricular assist devices. *Med. Eng. Phys.* **33**, 1041–1047 (2011).
22. Rogers, J. G. *et al.* Intrapericardial Left Ventricular Assist Device for Advanced Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **376**, 451–460 (2017).
23. Pagani, F. D. *et al.* Extended Mechanical Circulatory Support With a Continuous-Flow Rotary Left Ventricular Assist Device. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, 312–321 (2009).
24. Outcomes in Advanced Heart Failure Patients With Left Ventricular Assist Devices for Destination Therapy | *Circulation: Heart Failure*. https://www-ahajournals-org.proxy.insermbiblio.inist.fr/doi/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.111.963991?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed.
25. Schmitto, J. D., Hanke, J. S., Rojas, S. V., Avsar, M. & Haverich, A. First implantation in man of a new magnetically levitated left ventricular assist device (HeartMate III). *J. Heart Lung Transplant.* **34**, 858–860 (2015).
26. Netuka, I. *et al.* Fully Magnetically Levitated Left Ventricular Assist System for Treating Advanced HF. *J. Am. Coll. Cardiol.* **66**, 2579–2589 (2015).
27. Major, R., Ostrowski, R., Surmiak, M., Trembecka-Wójciga, K. & Lackner, J. M. Laser modified functional carbon-based coatings on titanium substrate for cardiac tissue integration and blood clotting inhibition. (2020) doi:10.34821/ENG.BIOMAT.155.2020.22-31.
28. Mehra, M. R. *et al.* Two-Year Outcomes with a Magnetically Levitated Cardiac Pump in Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1386–1395 (2018).
29. Berardi, C. *et al.* The History of Durable Left Ventricular Assist Devices and Comparison of Outcomes: HeartWare, HeartMate II, HeartMate 3, and the Future of Mechanical Circulatory Support. *J. Clin. Med.* **11**, 2022 (2022).
30. Pelletier, B. *et al.* System overview of the fully implantable destination therapy—ReinHeart—total artificial heart. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **47**, 80–86 (2015).

31. Brockhaus, M. K. *et al.* Downsizing of a Pulsatile Total Artificial Heart—The Effect on Hemolysis. *ASAIO J.* **68**, 34 (2022).
32. Fresiello, L. *et al.* Hemodynamic characterization of the Realheart® total artificial heart with a hybrid cardiovascular simulator. *Artif. Organs* **46**, 1585–1596 (2022).
33. Perkins, I. L. *et al.* In vitro hemolytic performance of the Realheart® V11C TAH prototype with porcine blood. *Artif. Organs* **n/a**.
34. Bornoff, J. *et al.* Fluid–structure interaction modelling of a positive-displacement Total Artificial Heart. *Sci. Rep.* **13**, 5734 (2023).
35. At the Cutting Edge of the Impossible - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov.proxy.insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC2763473/>.
36. Shuimacker, H. B. A surgeon to remember: Notes about vladimir demikhov. *Ann. Thorac. Surg.* **58**, 1196–1198 (1994).
37. Khan, S. & Jehangir, W. Evolution of Artificial Hearts: An Overview and History. *Cardiol. Res.* **5**, 121–125 (2014).
38. Bartlett, R. H. Extracorporeal Life Support: Gibbon Fulfilled. *J. Am. Coll. Surg.* **218**, 317 (2014).
39. Sewell’s Pump | The Eli Whitney Museum and Workshop. <https://www.eliwhitney.org/gilbert/sewells-pump>.
40. Mohacsi, P. & Leprince, P. The CARMAT total artificial heart. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **46**, 933–934 (2014).
41. Zareba, K. M. The artificial heart - past, present, and future. *Med. Sci. Monit.* **8**, RA72–RA77 (2002).
42. Robert Jarvik, MD on the Jarvik-7 | Jarvik Heart Inc. <https://www.jarvikheart.com/history/robert-jarvik-on-the-jarvik-7/> (2016).
43. Han, J. J. Aeson—The Carmat total artificial heart is approved for enrollment in the United States. *Artif. Organs* **45**, 445–446 (2021).

44. Smadja, D. M. *et al.* The Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart Is Associated With Early Hemostatic Recovery and no Acquired von Willebrand Syndrome in Calves. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **31**, 1595–1602 (2017).
45. Latrémouille, C. *et al.* Animal studies with the Carmat bioprosthetic total artificial heart†. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **47**, e172–e179 (2015).
46. Carpentier, A. *et al.* First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *The Lancet* **386**, 1556–1563 (2015).
47. Latrémouille, C. *et al.* A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 33–37 (2018).
48. Carpentier, A. *et al.* First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *Lancet Lond. Engl.* **386**, 1556–1563 (2015).
49. Latrémouille, C. *et al.* A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **37**, 33–37 (2018).
50. Arabia, F. A. *et al.* Interagency registry for mechanically assisted circulatory support report on the total artificial heart. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 1304–1312 (2018).
51. Carrier, M. *et al.* Outcomes after heart transplantation and total artificial heart implantation: A multicenter study. *J. Heart Lung Transplant.* **40**, 220–228 (2021).
52. Lavee, J. *et al.* An international multicenter experience of biventricular support with HeartMate 3 ventricular assist systems. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 1399–1402 (2018).
53. Carmat. CARMAT Document d'enregistrement universel 2022. <https://www.carmatsa.com/>
https://www.carmatsa.com/carmat-content/uploads/2023/05/CARMAT_DEU-2022_14-05-2023.pdf (2023).
54. Smadja, D. M. *et al.* Autoregulation of Pulsatile Bioprosthetic Total Artificial Heart is Involved in Endothelial Homeostasis Preservation. *Thromb. Haemost.* **120**, 1313–1322 (2020).

55. Bizouarn, P., Roussel, J.-C., Trochu, J.-N., Perlès, J.-C. & Latrémouille, C. Effects of pre-load variations on hemodynamic parameters with a pulsatile autoregulated artificial heart during the early post-operative period. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, 161–163 (2018).
56. Netuka, I. *et al.* First Clinical Experience With the Pressure Sensor–Based Autoregulation of Blood Flow in an Artificial Heart. *ASAIO J.* **Publish Ahead of Print**, (2021).
57. Carpentier, A. The surprising rise of nonthrombogenic valvular surgery. *Nat. Med.* **13**, 1165–1168 (2007).
58. Smadja, D. M. *et al.* Bioprosthetic Total Artificial Heart Induces a Profile of Acquired Hemocompatibility With Membranes Recellularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 404–406 (2017).
59. Plunkett, R. J. UNITED STATES PATENT OFFICE.
60. Gott, V. L., Alejo, D. E. & Cameron, D. E. Mechanical heart valves: 50 years of evolution. *Ann. Thorac. Surg.* **76**, S2230–S2239 (2003).
61. Xue, L. & Greisler, H. P. Biomaterials in the development and future of vascular grafts. *J. Vasc. Surg.* **37**, 472–480 (2003).
62. Zilla, P., Bezuidenhout, D. & Human, P. Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* **28**, 5009–5027 (2007).
63. Pennel, T., Zilla, P. & Bezuidenhout, D. Differentiating transmural from transanastomotic prosthetic graft endothelialization through an isolation loop-graft model. *J. Vasc. Surg.* **58**, 1053–1061 (2013).
64. Hytönen, J. P. *et al.* Improved endothelialization of small-diameter ePTFE vascular grafts through growth factor therapy. *Vasc. Biol.* **1**, 1–9 (2019).
65. Táborská, J., Riedelová, Z., Brynda, E., Májek, P. & Riedel, T. Endothelialization of an ePTFE vessel prosthesis modified with an antithrombogenic fibrin/heparin coating enriched with bound growth factors. *RSC Adv.* **11**, 5903–5913.

66. Improvements relating to the manufacture of highly polymeric substances by JAMES TENNANT DICKSON JOHN REX WHINFIELD: no binding | M.A. Stroh.
<https://www.abebooks.com/Improvements-relating-manufacture-highly-polymeric-substances/11630105285/bd>.
67. Hess, F. History of (MICRO) vascular surgery and the development of small-caliber blood vessel prostheses (with some notes on patency rates and re-endothelialization). *Microsurgery* **6**, 59–69 (1985).
68. Singh, C., Wong, C. S. & Wang, X. Medical Textiles as Vascular Implants and Their Success to Mimic Natural Arteries. *J. Funct. Biomater.* **6**, 500–525 (2015).
69. Sanger, P. W., Taylor, F. H., McCall, R. E., Duchesne, R. & Lepage, G. Seamless synthetic arterial grafts; preliminary report on experimental and clinical experiences. *J. Am. Med. Assoc.* **160**, 1403–1404 (1956).
70. Quarmby, J. W. *et al.* Prospective randomized trial of woven versus collagen-impregnated knitted prosthetic Dacron grafts in aortoiliac surgery. *Br. J. Surg.* **85**, 775–777 (1998).
71. Sottiurai, V. S. *et al.* Distal Anastomotic Intimal Hyperplasia: Histopathologic Character and Biogenesis. *Ann. Vasc. Surg.* **3**, 26–33 (1989).
72. Zilla, P., Deutsch, M., Bezuidenhout, D., Davies, N. H. & Pennel, T. Progressive Reinvention or Destination Lost? Half a Century of Cardiovascular Tissue Engineering. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 159 (2020).
73. Segmented Polyurethane: A New Elastomer for Biomedical Applications | Science.
https://www.science.org/doi/10.1126/science.158.3807.1481?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed.
74. Wang, G. B., Labow, R. S. & Santerre, J. P. Biodegradation of a poly(ester)urea-urethane by cholesterol esterase: Isolation and identification of principal biodegradation products. *J. Biomed. Mater. Res.* **36**, 407–417 (1997).

75. Mizumoto, D. *et al.* Comparative blood compatibility of polyether vs polycarbonate urethanes by epifluorescent video microscopy. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 **43**, M500-504 (1997).
76. Li, X. *et al.* Current usage and future directions for the bovine pericardial patch. *Ann. Vasc. Surg.* **25**, 561–568 (2011).
77. Richez, U. *et al.* Hemocompatibility and safety of the Carmat Total Artificial Heart hybrid membrane. *Heliyon* **5**, (2019).
78. Guyonnet, L. *et al.* Elevated Circulating Stem Cells Level is Observed One Month After Implantation of Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart. *Stem Cell Rev. Rep.* (2021) doi:10.1007/s12015-021-10270-3.
79. Lanfear, A. T., Hamandi, M., Fan, J., DiMaio, J. M. & George, T. J. Trends in HeartMate 3: What we know so far. *J. Card. Surg.* **35**, 180–187 (2020).
80. Hemocompatibility-related Adverse Events Following HeartMate II Left Ventricular Assist Device Implantation between Japan and United States - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/proxy/insermbiblio.inist.fr/pmc/articles/PMC7142632/>.
81. Hilal, T., Mudd, J. & DeLoughery, T. G. Hemostatic complications associated with ventricular assist devices. *Res. Pract. Thromb. Haemost.* **3**, 589–598 (2019).
82. Kirklin, J. K. *et al.* Long-term mechanical circulatory support (destination therapy): on track to compete with heart transplantation? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **144**, 584–603; discussion 597-598 (2012).
83. Starling, R. C. *et al.* Results of the post-U.S. Food and Drug Administration-approval study with a continuous flow left ventricular assist device as a bridge to heart transplantation: a prospective study using the INTERMACS (Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support). *J. Am. Coll. Cardiol.* **57**, 1890–1898 (2011).

84. Slaughter, M. S. *et al.* Advanced heart failure treated with continuous-flow left ventricular assist device. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2241–2251 (2009).
85. Miller, L. W. *et al.* Use of a continuous-flow device in patients awaiting heart transplantation. *N. Engl. J. Med.* **357**, 885–896 (2007).
86. Park, S. J. *et al.* Outcomes in advanced heart failure patients with left ventricular assist devices for destination therapy. *Circ. Heart Fail.* **5**, 241–248 (2012).
87. Starling, R. C. *et al.* Unexpected abrupt increase in left ventricular assist device thrombosis. *N. Engl. J. Med.* **370**, 33–40 (2014).
88. Kirklin, J. K. *et al.* Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) analysis of pump thrombosis in the HeartMate II left ventricular assist device. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **33**, 12–22 (2014).
89. Grinstein, J. *et al.* Adverse Hemodynamic Consequences of Continuous Left Ventricular Mechanical Support: JACC Review Topic of the Week. *J. Am. Coll. Cardiol.* **82**, 70–81 (2023).
90. Mehra, M. R. *et al.* Two-Year Outcomes with a Magnetically Levitated Cardiac Pump in Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **378**, 1386–1395 (2018).
91. Dang, G. *et al.* Medical Management of Pump-Related Thrombosis in Patients with Continuous-Flow Left Ventricular Assist Devices: A Systematic Review and Meta-Analysis. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **63**, 373–385 (2017).
92. Seese, L., Hickey, G., Keebler, M., Thoma, F. & Kilic, A. Limited Efficacy of Thrombolytics for Pump Thrombosis in Durable Left Ventricular Assist Devices. *Ann. Thorac. Surg.* **110**, 2047–2054 (2020).
93. Baumann Kreuziger, L., Slaughter, M. S., Sundareswaran, K. & Mast, A. E. Clinical Relevance of Histopathologic Analysis of HeartMate II Thrombi. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **64**, 754–759 (2018).

94. Da, Q. *et al.* Free hemoglobin increases von Willebrand factor-mediated platelet adhesion in vitro: implications for circulatory devices. *Blood* **126**, 2338–2341 (2015).
95. Auton, M. *et al.* Destabilization of the A1 Domain in von Willebrand Factor Dissociates the A1A2A3 Tri-domain and Provokes Spontaneous Binding to Glycoprotein Iba and Platelet Activation under Shear Stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 22831–22839 (2010).
96. Roberts, N., Chandrasekaran, U., Das, S., Qi, Z. & Corbett, S. Hemolysis associated with Impella heart pump positioning: In vitro hemolysis testing and computational fluid dynamics modeling. *Int. J. Artif. Organs* 391398820909843 (2020) doi:10.1177/0391398820909843.
97. Arora, D., Behr, M. & Pasquali, M. Hemolysis estimation in a centrifugal blood pump using a tensor-based measure. *Artif. Organs* **30**, 539–547 (2006).
98. Arora, D., Behr, M. & Pasquali, M. A tensor-based measure for estimating blood damage. *Artif. Organs* **28**, 1002–1015 (2004).
99. Hellums, J. D. 1993 Whitaker Lecture: biorheology in thrombosis research. *Ann. Biomed. Eng.* **22**, 445–455 (1994).
100. Poitier, B. *et al.* Bioprosthetic Total Artificial Heart in Autoregulated Mode Is Biologically Hemocompatible: Insights for Multimers of von Willebrand Factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **42**, 470–480 (2022).
101. Birschmann, I. *et al.* Ambient hemolysis and activation of coagulation is different between HeartMate II and HeartWare left ventricular assist devices. *J. Heart Lung Transplant.* **33**, 80–87 (2014).
102. Thamsen, B. *et al.* Numerical Analysis of Blood Damage Potential of the HeartMate II and HeartWare HVAD Rotary Blood Pumps. *Artif. Organs* **39**, 651–659 (2015).
103. Kaya, E. *et al.* Effects of Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Therapy on Peripheral Vascular Function. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 **68**, 214–219 (2022).

104. Cortese, F. *et al.* Continuous flow left ventricular assist devices do not worsen endothelial function in subjects with chronic heart failure: a pilot study. *ESC Heart Fail.* **8**, 3587–3593 (2021).
105. Watanabe, A. *et al.* Significant impact of left ventricular assist device models on the value of flow-mediated dilation: effects of LVAD on endothelial function. *Heart Vessels* **35**, 207–213 (2020).
106. Sansone, R. *et al.* Macrovascular and microvascular function after implantation of left ventricular assist devices in end-stage heart failure: Role of microparticles. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **34**, 921–932 (2015).
107. Ivak, P. *et al.* The Effect of Artificial Pulsatility on the Peripheral Vasculature in Patients With Continuous-Flow Ventricular Assist Devices. *Can. J. Cardiol.* **37**, 1578–1585 (2021).
108. Ivak, P. *et al.* Endothelial dysfunction expressed as endothelial microparticles in patients with end-stage heart failure. *Physiol. Res.* **63**, S369-373 (2014).
109. Kramser, N. *et al.* Thromboembolic Events in Patients With Left Ventricular Assist Devices Are Related to Microparticle-Induced Coagulation. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **67**, 59–66 (2021).
110. Dlouha, D. *et al.* The effect of long-term left ventricular assist device support on flow-sensitive plasma microRNA levels. *Int. J. Cardiol.* **339**, 138–143 (2021).
111. Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K. & Calin, G. A. Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Mol. Oncol.* **11**, 1673–1686 (2017).
112. Sun, H.-X. *et al.* Essential role of microRNA-155 in regulating endothelium-dependent vasorelaxation by targeting endothelial nitric oxide synthase. *Hypertens. Dallas Tex* **1979** **60**, 1407–1414 (2012).
113. Harris, T. A., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Mendell, J. T. & Lowenstein, C. J. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 1516–1521 (2008).

114. Cerutti, C. *et al.* MiR-126 and miR-126* regulate shear-resistant firm leukocyte adhesion to human brain endothelium. *Sci. Rep.* **7**, 45284 (2017).
115. Li, J., Yang, C. & Wang, Y. miR-126 overexpression attenuates oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and inflammatory response via the activation of SIRT1/Nrf2 signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* **23**, 165 (2021).
116. Jia, W. *et al.* MircoRNA-126-5p inhibits apoptosis of endothelial cell in vascular arterial walls via NF-κB/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in atherosclerosis. *J. Mol. Histol.* **53**, 51–62 (2022).
117. Afonyushkin, T., Oskolkova, O. V. & Bochkov, V. N. Permissive role of miR-663 in induction of VEGF and activation of the ATF4 branch of unfolded protein response in endothelial cells by oxidized phospholipids. *Atherosclerosis* **225**, 50–55 (2012).
118. Sun, J., Ge, Y., Chao, T., Bai, R. & Wang, C. The Role of miRNA in the Regulation of Angiogenesis in Ischemic Heart Disease. *Curr. Probl. Cardiol.* **48**, 101637 (2023).
119. Hoefler, I. E., den Adel, B. & Daemen, M. J. A. P. Biomechanical factors as triggers of vascular growth. *Cardiovasc. Res.* **99**, 276–283 (2013).
120. Smadja, D. M. *et al.* Autoregulation of Pulsatile Bioprosthetic Total Artificial Heart is Involved in Endothelial Homeostasis Preservation. *Thromb. Haemost.* **120**, 1313–1322 (2020).
121. Adams, J. A., Uryash, A. & Lopez, J. R. Non-Invasive Pulsatile Shear Stress Modifies Endothelial Activation; A Narrative Review. *Biomedicines* **10**, 3050 (2022).
122. Vincent, F. *et al.* Arterial Pulsatility and Circulating von Willebrand Factor in Patients on Mechanical Circulatory Support. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 2106–2118 (2018).
123. Schaub, R. D., Kameneva, M. V., Borovetz, H. S. & Wagner, W. R. Assessing acute platelet adhesion on opaque metallic and polymeric biomaterials with fiber optic microscopy. *J. Biomed. Mater. Res.* **49**, 460–468 (2000).

124. Maas, C. & Renné, T. Regulatory mechanisms of the plasma contact system. *Thromb. Res.* **129 Suppl 2**, S73-76 (2012).
125. Himmelreich, G. *et al.* Pathophysiologic role of contact activation in bleeding followed by thromboembolic complications after implantation of a ventricular assist device. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 **41**, M790-794 (1995).
126. Latrémouille, C. *et al.* Animal studies with the Carmat bioprosthetic total artificial heart. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **47**, e172-178; discussion e178-179 (2015).
127. Smadja, D. M. *et al.* The Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart Is Associated With Early Hemostatic Recovery and no Acquired von Willebrand Syndrome in Calves. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* **31**, 1595–1602 (2017).
128. Smadja, D. M. *et al.* Bioprosthetic Total Artificial Heart Induces a Profile of Acquired Hemocompatibility With Membranes Recellularization. *J. Am. Coll. Cardiol.* **70**, 404–406 (2017).
129. Guerin, C. L. *et al.* Multidimensional Proteomic Approach of Endothelial Progenitors Demonstrate Expression of KDR Restricted to CD19 Cells. *Stem Cell Rev. Rep.* **17**, 639–651 (2021).
130. Guyonnet, L. *et al.* Elevated Circulating Stem Cells Level is Observed One Month After Implantation of Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart. *Stem Cell Rev. Rep.* **17**, 2332–2337 (2021).
131. Li, Z., Zhao, H. & Wang, J. Metabolism and Chronic Inflammation: The Links Between Chronic Heart Failure and Comorbidities. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 650278 (2021).
132. Briasoulis, A., Androulakis, E., Christophides, T. & Tousoulis, D. The role of inflammation and cell death in the pathogenesis, progression and treatment of heart failure. *Heart Fail. Rev.* **21**, 169–176 (2016).
133. Emdin, M. *et al.* sST2 Predicts Outcome in Chronic Heart Failure Beyond NT-proBNP and High-Sensitivity Troponin T. *J. Am. Coll. Cardiol.* **72**, 2309–2320 (2018).

134. Chow, S. L. *et al.* Role of Biomarkers for the Prevention, Assessment, and Management of Heart Failure: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation* **135**, e1054–e1091 (2017).
135. Grosman-Rimon, L. *et al.* Markers of inflammation in recipients of continuous-flow left ventricular assist devices. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **60**, 657–663 (2014).
136. Sciacaluga, C. *et al.* Biomarkers in Patients with Left Ventricular Assist Device: An Insight on Current Evidence. *Biomolecules* **12**, 334 (2022).
137. Saito, S. *et al.* End-organ function during chronic nonpulsatile circulation. *Ann. Thorac. Surg.* **74**, 1080–1085 (2002).
138. Welp, H. *et al.* Effect of Pulsatile and Non-pulsatile Left Ventricular Assist Devices on the Renin-Angiotensin System in Patients with End-Stage Heart Failure. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **58**, S185–S188 (2010).
139. Masai, T. *et al.* Hepatic dysfunction after left ventricular mechanical assist in patients with end-stage heart failure: role of inflammatory response and hepatic microcirculation. *Ann. Thorac. Surg.* **73**, 549–555 (2002).
140. Caruso, R. *et al.* Early Expression of Pro- and Anti-Inflammatory Cytokines in Left Ventricular Assist Device Recipients With Multiple Organ Failure Syndrome. *ASAIO J.* **56**, 313 (2010).
141. Caruso, R. *et al.* Severity of oxidative stress and inflammatory activation in end-stage heart failure patients are unaltered after 1 month of left ventricular mechanical assistance. *Cytokine* **59**, 138–144 (2012).
142. Caruso, R. *et al.* Myocardial interleukin-6 in the setting of left ventricular mechanical assistance: relation with outcome and C-reactive protein. *Clin. Chem. Lab. Med. CCLM* **53**, 1359–1366 (2015).
143. Ankersmit, H. J. *et al.* Activation-induced T-cell death and immune dysfunction after implantation of left-ventricular assist de vice. *The Lancet* **354**, 550–555 (1999).

144. Deng, M. C. *et al.* Left ventricular assist system support is associated with persistent inflammation and temporary immunosuppression. *Thorac. Cardiovasc. Surg.* **47 Suppl 2**, 326–331 (1999).
145. Bartoli, C. R. *et al.* Nonphysiologic blood flow triggers endothelial and arterial remodeling in vivo: Implications for novel left ventricular assist devices with a peripheral anastomosis. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **148**, 311–321 (2014).
146. Kang, J. *et al.* Continuous-Flow LVAD Support Causes a Distinct Form of Intestinal Angiodysplasia. *Circ. Res.* **121**, 963–969 (2017).
147. Walenga, J. M. *et al.* Protein C Pathway, Inflammation, and Pump Thrombosis in Patients With Left Ventricular Assist Devices. *Clin. Appl. Thromb.* **26**, 1076029620959724 (2020).
148. Bruggink, A. H., van Oosterhout, M. F. M., De Jonge, N., Gmelig-Meyling, F. H. J. & De Weger, R. A. TNF α in patients with end-stage heart failure on medical therapy or supported by a left ventricular assist device. *Transpl. Immunol.* **19**, 64–68 (2008).
149. Goldstein, D. J. *et al.* Circulatory Resuscitation With Left Ventricular Assist Device Support Reduces Interleukins 6 and 8 Levels. *Ann. Thorac. Surg.* **63**, 971–974 (1997).
150. Loebe, M. *et al.* Inflammatory Response after Implantation of a Left Ventricular Assist Device: Comparison between the Axial Flow MicroMed DeBakey VAD and the Pulsatile Novacor Device. *ASAIO J.* **47**, 272 (2001).
151. Thoennissen, N. H. *et al.* Influence of Inflammation and Pump Dynamic on Cerebral Microembolization in Patients with Continuous-Flow DeBakey LVAD. *ASAIO J.* **52**, 243 (2006).
152. Grosman-Rimon, L. *et al.* Markers of Inflammation in Recipients of Continuous-Flow Left Ventricular Assist Devices. *ASAIO J.* **60**, 657–663 (2014).
153. Alikhani, M., Roy, S. & Graves, D. T. FOXO1 plays an essential role in apoptosis of retinal pericytes. *Mol. Vis.* **16**, 408–415 (2010).

154. Cai, J., Kehoe, O., Smith, G. M., Hykin, P. & Boulton, M. E. The Angiopoietin/Tie-2 System Regulates Pericyte Survival and Recruitment in Diabetic Retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 2163–2171 (2008).
155. Tabit, C. E. *et al.* Tumor necrosis factor- α levels and non-surgical bleeding in continuous-flow left ventricular assist devices. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **37**, 107–115 (2018).
156. Lappegård, K. T. *et al.* The artificial surface-induced whole blood inflammatory reaction revealed by increases in a series of chemokines and growth factors is largely complement dependent. *J. Biomed. Mater. Res. A* **87**, 129 (2008).
157. Takahashi, T. *et al.* Serum C-reactive protein elevation in left ventricular remodeling after acute myocardial infarction—role of neurohormones and cytokines. *Int. J. Cardiol.* **88**, 257–265 (2003).
158. Granja, T. *et al.* Left ventricular assist device implantation causes platelet dysfunction and proinflammatory platelet-neutrophil interaction. *Platelets* **33**, 132–140 (2022).
159. Woolley, J. R. *et al.* Temporal Leukocyte Numbers and Granulocyte Activation in Pulsatile and Rotary Ventricular Assist Device Patients. *Artif. Organs* **38**, 447–455 (2014).
160. Pronschinske, K. B. *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C for the prediction of clinical events in patients with advanced heart failure and after ventricular assist device placement. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **33**, 1215–1222 (2014).
161. Grosman-Rimon, L. *et al.* Biomarkers of Inflammation, Fibrosis, and Acute Kidney Injury in Patients with Heart Failure with and without Left Ventricular Assist Device Implantation. *Cardiorenal Med.* **9**, 108–116 (2019).

162. Hennessy-Strahs, S., Bermudez, C. A., Acker, M. A. & Bartoli, C. R. Toward a Standard Practice to Quantify von Willebrand Factor Degradation During Left Ventricular Assist Device Support. *Ann. Thorac. Surg.* **112**, 1257–1264 (2021).
163. Bartoli, C. R. Pathologic von Willebrand factor degradation is a major contributor to left ventricular assist device-associated bleeding: pathophysiology and evolving clinical management. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **10**, 389–392 (2021).
164. Pannekoek, H. & Voorberg, J. Molecular cloning, expression and assembly of multimeric von Willebrand factor. *Baillieres Clin. Haematol.* **2**, 879–896 (1989).
165. Zhou, Y.-F. *et al.* Sequence and structure relationships within von Willebrand factor. *Blood* **120**, 449–458 (2012).
166. Marti, T., Rösselet, S. J., Titani, K. & Walsh, K. A. Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* **26**, 8099–8109 (1987).
167. Katsumi, A., Tuley, E. A., Bodó, I. & Sadler, J. E. Localization of Disulfide Bonds in the Cystine Knot Domain of Human von Willebrand Factor*. *J. Biol. Chem.* **275**, 25585–25594 (2000).
168. Lenting, P. J., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor biosynthesis, secretion, and clearance: connecting the far ends. *Blood* **125**, 2019–2028 (2015).
169. Franck, W. G. Von Willebrand's Disease. *N. Engl. J. O F Med.* (2016)
doi:10.1056/NEJMra1601561.
170. Nightingale, T. & Cutler, D. The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 192–201 (2013).
171. Giblin, J. P., Hewlett, L. J. & Hannah, M. J. Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* **112**, 957–964 (2008).
172. Rojo Pulido, I. *et al.* Myosin Va Acts in Concert with Rab27a and MyRIP to Regulate Acute Von-Willebrand Factor Release from Endothelial Cells. *Traffic* **12**, 1371–1382 (2011).

173. de Leeuw, H. P., Wijers-Koster, P. M., van Mourik, J. A. & Voorberg, J. Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb. Haemost.* **82**, 1177–1181 (1999).
174. van Breevoort, D. *et al.* STXBP1 promotes Weibel-Palade body exocytosis through its interaction with the Rab27A effector Slp4-a. *Blood* **123**, 3185–3194 (2014).
175. Brown, S. A., Eldridge, A., Collins, P. W. & Bowen, D. J. Increased clearance of von Willebrand factor antigen post-DDAVP in Type 1 von Willebrand disease: is it a potential pathogenic process? *J. Thromb. Haemost.* **1**, 1714–1717 (2003).
176. Gallinaro, L. *et al.* A shorter von Willebrand factor survival in O blood group subjects explains how ABO determinants influence plasma von Willebrand factor. *Blood* **111**, 3540–3545 (2008).
177. Casari, C., Lenting, P. J., Wohner, N., Christophe, O. D. & Denis, C. V. Clearance of von Willebrand factor. *J. Thromb. Haemost.* **11**, 202–211 (2013).
178. van Schooten, C. J. *et al.* Macrophages contribute to the cellular uptake of von Willebrand factor and factor VIII in vivo. *Blood* **112**, 1704–1712 (2008).
179. Lenting, P. J., Casari, C., Christophe, O. D. & Denis, C. V. von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J. Thromb. Haemost.* **10**, 2428–2437 (2012).
180. Wise, R. J., Pittman, D. D., Handin, R. I., Kaufman, R. J. & Orkin, S. H. The propeptide of von Willebrand factor independently mediates the assembly of von Willebrand multimers. *Cell* **52**, 229–236 (1988).
181. Lenting, P. J., van Mourik, J. A. & Mertens, K. The Life Cycle of Coagulation Factor VIII in View of Its Structure and Function. *Blood* **92**, 3983–3996 (1998).
182. Michaux, G., Pullen, T. J., Haberichter, S. L. & Cutler, D. F. P-selectin binds to the D'-D3 domains of von Willebrand factor in Weibel-Palade bodies. *Blood* **107**, 3922–3924 (2006).
183. Pendu, R. *et al.* P-selectin glycoprotein ligand 1 and β 2-integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor. *Blood* **108**, 3746–3752 (2006).

184. Fujimura, Y. *et al.* von Willebrand factor. A reduced and alkylated 52/48-kDa fragment beginning at amino acid residue 449 contains the domain interacting with platelet glycoprotein Ib. *J. Biol. Chem.* **261**, 381–385 (1986).
185. Shahbazi, S. *et al.* Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1956–1962 (2007).
186. Hulstein, J. J. J. *et al.* β 2-Glycoprotein I inhibits von Willebrand factor–dependent platelet adhesion and aggregation. *Blood* **110**, 1483–1491 (2007).
187. Denis, C. *et al.* Localization of von Willebrand factor binding domains to endothelial extracellular matrix and to type VI collagen. *Arterioscler. Thromb. J. Vasc. Biol.* **13**, 398–406 (1993).
188. Crawley, J. T. B., de Groot, R., Xiang, Y., Luken, B. M. & Lane, D. A. Unraveling the scissile bond: how ADAMTS13 recognizes and cleaves von Willebrand factor. *Blood* **118**, 3212–3221 (2011).
189. Pareti, F. I., Niiya, K., McPherson, J. M. & Ruggeri, Z. M. Isolation and characterization of two domains of human von Willebrand factor that interact with fibrillar collagen types I and III. *J. Biol. Chem.* **262**, 13835–13841 (1987).
190. Pimanda, J. E. *et al.* Role of Thrombospondin-1 in Control of von Willebrand Factor Multimer Size in Mice*. *J. Biol. Chem.* **279**, 21439–21448 (2004).
191. van Breevoort, D. *et al.* Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies. *J. Proteome Res.* **11**, 2925–2936 (2012).
192. Beacham, D. A., Wise, R. J., Turci, S. M. & Handin, R. I. Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 3409–3415 (1992).
193. Keuren, Jeffrey F. W. *et al.* Von Willebrand factor C1C2 domain is involved in platelet adhesion to polymerized fibrin at high shear rate. *Blood* **103**, 1741–1746 (2004).

194. Pi, L. *et al.* CCN2/CTGF regulates neovessel formation via targeting structurally conserved cystine knot motifs in multiple angiogenic regulators. *FASEB J.* **26**, 3365–3379 (2012).
195. Saint-Lu, N. *et al.* Identification of Galectin-1 and Galectin-3 as Novel Partners for Von Willebrand Factor. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**, 894–901 (2012).
196. Pegon, J. N. *et al.* Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5. *Haematologica* **97**, 1855–1863 (2012).
197. Starke, R. D. *et al.* Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood* **117**, 1071–1080 (2011).
198. Bierings, R. *et al.* Efficiency of von Willebrand factor-mediated targeting of interleukin-8 into Weibel–Palade bodies. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 2512–2519 (2007).
199. Rastegarlar, G. *et al.* Macrophage LRP1 contributes to the clearance of von Willebrand factor. *Blood* **119**, 2126–2134 (2012).
200. Horiuchi, H., Doman, T., Kokame, K., Saiki, Y. & Matsumoto, M. Acquired von Willebrand Syndrome Associated with Cardiovascular Diseases. *J. Atheroscler. Thromb.* **26**, 303–314 (2019).
201. Physiologie de l’hémostase. *MHEMO* <https://mhemofr.fr/les-pathologies/physiologie-de-lhemostase/>.
202. Schlagenhaut, A., Kalbhenn, J., Geisen, U., Beyersdorf, F. & Zieger, B. Acquired von Willebrand Syndrome and Platelet Function Defects during Extracorporeal Life Support (Mechanical Circulatory Support). *Hämostaseologie* **40**, 221–225 (2020).
203. Granja, T. *et al.* Left ventricular assist device implantation causes platelet dysfunction and proinflammatory platelet-neutrophil interaction. *Platelets* **0**, 1–9 (2020).
204. Smadja, D. M. *et al.* Intermediate-dose prophylactic anticoagulation with low molecular weight heparin is safe after bioprosthetic artificial heart implantation. *J. Heart Lung Transplant.* **41**, 1214–1217 (2022).

205. Crow, S. *et al.* Comparative analysis of von Willebrand factor profiles in pulsatile and continuous left ventricular assist device recipients. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 **56**, 441–445 (2010).
206. Lahpor, J. *et al.* European results with a continuous-flow ventricular assist device for advanced heart-failure patients. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **37**, 357–361 (2010).
207. Wieselthaler, G. M. *et al.* Initial clinical experience with a novel left ventricular assist device with a magnetically levitated rotor in a multi-institutional trial. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **29**, 1218–1225 (2010).
208. Meyer, A. L. *et al.* Acquired von Willebrand syndrome in patients with a centrifugal or axial continuous flow left ventricular assist device. *JACC Heart Fail.* **2**, 141–145 (2014).
209. Mehra, M. R. *et al.* Five-Year Outcomes in Patients With Fully Magnetically Levitated vs Axial-Flow Left Ventricular Assist Devices in the MOMENTUM 3 Randomized Trial. *JAMA* **328**, 1233–1242 (2022).
210. Graves, J. M. *et al.* Established Clinical Prediction Rules for Bleeding had Mediocre Discrimination in Left Ventricular Assist Device Recipients. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 1992 (2022) doi:10.1097/MAT.0000000000001816.
211. Pourtau, L. *et al.* Prevalence, management, and outcomes of haemorrhagic events in left ventricular assist device recipients. *ESC Heart Fail.* **9**, 1931–1941 (2022).
212. Kataria, R. & Jorde, U. P. Gastrointestinal Bleeding During Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Support: State of the Field. *Cardiol. Rev.* **27**, 8–13 (2019).
213. Gill, J. C., Endres-Brooks, J., Bauer, P. J., Marks, W. J. & Montgomery, R. R. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* **69**, 1691–1695 (1987).

214. Tscharre, M. *et al.* Impact of ABO Blood Group on Thromboembolic and Bleeding Complications in Patients with Left Ventricular Assist Devices. *Thromb. Haemost.* **123**, 336–346 (2023).
215. Netuka, I. *et al.* Evaluation of low-intensity anti-coagulation with a fully magnetically levitated centrifugal-flow circulatory pump-the MAGENTUM 1 study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **37**, 579–586 (2018).
216. Mehra, M. R. *et al.* Aspirin and left ventricular assist devices: rationale and design for the international randomized, placebo-controlled, non-inferiority ARIES HM3 trial. *Eur. J. Heart Fail.* **23**, 1226–1237 (2021).
217. Bartoli, C. R. *et al.* Inhibition of ADAMTS-13 by Doxycycline Reduces von Willebrand Factor Degradation During Supraphysiological Shear Stress: Therapeutic Implications for Left Ventricular Assist Device-Associated Bleeding. *JACC Heart Fail.* **3**, 860–869 (2015).
218. Imamura, T. *et al.* Omega-3 Therapy Is Associated With Reduced Gastrointestinal Bleeding in Patients With Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device. *Circ. Heart Fail.* **11**, e005082 (2018).
219. Asleh, R. *et al.* Intravenous bevacizumab as a novel treatment for refractory left ventricular assist device-related gastrointestinal bleeding. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **39**, 492–495 (2020).
220. Geisen, U. *et al.* Non-surgical bleeding in patients with ventricular assist devices could be explained by acquired von Willebrand disease. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **33**, 679–684 (2008).
221. Vincentelli, A. *et al.* Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* **349**, 343–349 (2003).
222. Van Belle, E. *et al.* Von Willebrand factor as a biological sensor of blood flow to monitor percutaneous aortic valve interventions. *Circ. Res.* **116**, 1193–1201 (2015).

223. Tsai, H. M., Sussman, I. I. & Nagel, R. L. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* **83**, 2171–2179 (1994).
224. Dong, J. *et al.* ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100**, 4033–4039 (2002).
225. Kroll, M. H., Hellums, J. D., McIntire, L. V., Schafer, A. I. & Moake, J. L. Platelets and shear stress. *Blood* **88**, 1525–1541 (1996).
226. Ikeda, Y. *et al.* The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress. *J. Clin. Invest.* **87**, 1234–1240 (1991).
227. Moake, J. L., Turner, N. A., Stathopoulos, N. A., Nolasco, L. & Hellums, J. D. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* **71**, 1366–1374 (1988).
228. Chow, T. W., Hellums, J. D., Moake, J. L. & Kroll, M. H. Shear stress-induced von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib initiates calcium influx associated with aggregation. *Blood* **80**, 113–120 (1992).
229. Bartoli, C. R. *et al.* Clinical and In Vitro Evidence That Subclinical Hemolysis Contributes to LVAD Thrombosis. *Ann. Thorac. Surg.* **105**, 807–814 (2018).
230. Zhang, J. *et al.* Platelet aggregation and activation under complex patterns of shear stress. *Thromb. Haemost.* **88**, 817–821 (2002).
231. Zhang, J. *et al.* Duration of exposure to high fluid shear stress is critical in shear-induced platelet activation-aggregation. *Thromb. Haemost.* **90**, 672–678 (2003).
232. Tripodi, A. *et al.* Measurement of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS-13): results of an international collaborative study involving 11 methods testing the same set of coded plasmas. *J. Thromb. Haemost. JTH* **2**, 1601–1609 (2004).

233. Kokame, K., Nobe, Y., Kokubo, Y., Okayama, A. & Miyata, T. FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br. J. Haematol.* **129**, 93–100 (2005).
234. Nascimbene, A. *et al.* von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13 in patients on left ventricular assist device support. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **36**, 477–479 (2017).
235. Fu, X. *et al.* Shear stress-induced unfolding of VWF accelerates oxidation of key methionine residues in the A1A2A3 region. *Blood* **118**, 5283–5291 (2011).
236. Mondal, N. K. *et al.* Systemic Inflammatory Response Syndrome in End-Stage Heart Failure Patients Following Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Implantation: Differences in Plasma Redox Status and Leukocyte Activation. *Artif. Organs* **40**, 434–443 (2016).
237. Mondal, N. K. *et al.* Association of Oxidative Stress and Platelet Receptor Glycoprotein GPIIb/IIIa and GPVI Shedding During Nonsurgical Bleeding in Heart Failure Patients With Continuous-Flow Left Ventricular Assist Device Support. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **64**, 462–471 (2018).
238. Chen, J. *et al.* Oxidative modification of von Willebrand factor by neutrophil oxidants inhibits its cleavage by ADAMTS13. *Blood* **115**, 706–712 (2010).
239. Wang, Y. *et al.* Hypochlorous acid generated by neutrophils inactivates ADAMTS13: an oxidative mechanism for regulating ADAMTS13 proteolytic activity during inflammation. *J. Biol. Chem.* **290**, 1422–1431 (2015).
240. Zhou, Z. *et al.* Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease. *Thromb. Haemost.* **101**, 1070–1077 (2009).
241. Martin, C., Morales, L. D. & Cruz, M. A. Purified A2 domain of von Willebrand factor binds to the active conformation of von Willebrand factor and blocks the interaction with platelet glycoprotein Iba1. *J. Thromb. Haemost. JTH* **5**, 1363–1370 (2007).

242. Butera, D. *et al.* Autoregulation of von Willebrand factor function by a disulfide bond switch. *Sci. Adv.* **4**, eaaq1477 (2018).
243. Ju, L. Dynamic Force Spectroscopy Analysis on the Redox States of Protein Disulphide Bonds. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1967**, 115–131 (2019).
244. Interlandi, G. Destabilization of the von Willebrand factor A2 domain under oxidizing conditions investigated by molecular dynamics simulations. *PLoS One* **13**, e0203675 (2018).
245. Yang, M. *et al.* Hyperadhesive von Willebrand Factor Promotes Extracellular Vesicle-Induced Angiogenesis: Implication for LVAD-Induced Bleeding. *JACC Basic Transl. Sci.* **7**, 247–261 (2022).
246. Suarez, J. *et al.* Mechanisms of bleeding and approach to patients with axial-flow left ventricular assist devices. *Circ. Heart Fail.* **4**, 779–784 (2011).
247. Zhou, Y. *et al.* Quantification of Von Willebrand Factor Cleavage by adamts-13 in Patients Supported by Left Ventricular Assist Devices. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1992** **63**, 849–853 (2017).
248. Copeland, J. G. *et al.* Experience with more than 100 total artificial heart implants. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **143**, 727–734 (2012).
249. David, C.-H. *et al.* A heart transplant after total artificial heart support: initial and long-term results. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **58**, 1175–1181 (2020).
250. Heilmann, C. *et al.* Acquired von Willebrand syndrome in patients with ventricular assist device or total artificial heart. *Thromb. Haemost.* **103**, 962–967 (2010).
251. Reich, H. J. *et al.* Comparative analysis of von Willebrand factor profiles after implantation of left ventricular assist device and total artificial heart. *J. Thromb. Haemost. JTH* **15**, 1620–1624 (2017).
252. Oezpeker, C. *et al.* Changes in Von Willebrand factor profile predicts clinical outcomes in patients on mechanical circulatory support. *J. Card. Surg.* **33**, 693–702 (2018).

253. Rauch, A. *et al.* Antibody-based prevention of von Willebrand factor degradation mediated by circulatory assist devices. *Thromb. Haemost.* **112**, 1014–1023 (2014).
254. Connors, J. M., Gregor, S., Crandall, D., Netuka, I. & Mehra, M. R. Low-intensity anticoagulation using Vitamin K antagonists and Factor X activity: A validation analysis of the MAGENTUM-1 study. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **38**, 668–669 (2019).
255. Copeland, J. G. SynCardia Total Artificial Heart: update and future. *Tex. Heart Inst. J.* **40**, 587–588 (2013).
256. Smadja, D. M. *et al.* Intermediate-dose prophylactic anticoagulation with low molecular weight heparin is safe after bioprosthetic artificial heart implantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* S1053-2498(22)01956-8 (2022)
doi:10.1016/j.healun.2022.05.017.
257. Shah, P. *et al.* Twelfth Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support Report: Readmissions After Left Ventricular Assist Device. *Ann. Thorac. Surg.* **113**, 722–737 (2022).
258. Cho, S.-M., Moazami, N., Katz, S., Starling, R. & Frontera, J. A. Reversal and Resumption of Antithrombotic Therapy in LVAD-Associated Intracranial Hemorrhage. *Ann. Thorac. Surg.* **108**, 52–58 (2019).
259. Loyaga-Rendon, R. Y., Kazui, T. & Acharya, D. Antiplatelet and anticoagulation strategies for left ventricular assist devices. *Ann. Transl. Med.* **9**, 521 (2021).
260. Kormos, R. L. *et al.* The Society of Thoracic Surgeons Intermacs database annual report: Evolving indications, outcomes, and scientific partnerships. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **38**, 114–126 (2019).
261. Kassi, M. *et al.* Outflow cannula alignment in continuous flow left ventricular devices is associated with stroke. *Int. J. Artif. Organs* **46**, 226–234 (2023).

262. Bishawi, M. *et al.* Risk factors for stroke on left ventricular assist devices. *J. Card. Surg.* **33**, 348–352 (2018).
263. Pullicino, P. M., Halperin, J. L. & Thompson, J. L. Stroke in patients with heart failure and reduced left ventricular ejection fraction. *Neurology* **54**, 288–294 (2000).
264. Aggarwal, A. *et al.* Are blood stream infections associated with an increased risk of hemorrhagic stroke in patients with a left ventricular assist device? *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **58**, 509–513 (2012).
265. Menon, A. K. *et al.* Low stroke rate and few thrombo-embolic events after HeartMate II implantation under mild anticoagulation. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* **42**, 319–323; discussion 323 (2012).
266. Najjar, S. S. *et al.* An analysis of pump thrombus events in patients in the HeartWare ADVANCE bridge to transplant and continued access protocol trial. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **33**, 23–34 (2014).
267. Simon, D. *et al.* Left Ventricular Assist Device—Related Infection: Treatment and Outcome. *Clin. Infect. Dis.* **40**, 1108–1115 (2005).
268. Koval, C. E., Thuita, L., Moazami, N. & Blackstone, E. Evolution and impact of drive-line infection in a large cohort of continuous-flow ventricular assist device recipients. *J. Heart Lung Transplant.* **33**, 1164–1172 (2014).
269. Hernandez, G. A., Breton, J. D. N. & Chaparro, S. V. Driveline Infection in Ventricular Assist Devices and Its Implication in the Present Era of Destination Therapy. *Open J. Cardiovasc. Surg.* **9**, 1179065217714216 (2017).
270. Leuck, A.-M. Left ventricular assist device driveline infections: recent advances and future goals. *J. Thorac. Dis.* **7**, 2151–2157 (2015).
271. Cikirikcioglu, M. *et al.* Treatment of HeartMate III–LVAD driveline infection by negative pressure wound therapy: Result of our case series. *Int. J. Artif. Organs* **44**, 912–916 (2021).

272. Püschel, A., Skusa, R., Bollensdorf, A. & Gross, J. Local Treatment of Driveline Infection with Bacteriophages. *Antibiotics* **11**, 1310 (2022).
273. Veyradier, A., Obert, B., Houllier, A., Meyer, D. & Girma, J.-P. Specific von Willebrand factor–cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* **98**, 1765–1772 (2001).
274. Pikta, M. *et al.* Evaluation of a new semi-automated Hydrigel 11 von Willebrand factor multimers assay kit for routine use. *J. Med. Biochem.* **40**, 167–172 (2021).
275. Bartoli, C. R., Restle, D. J., Zhang, D. M., Acker, M. A. & Atluri, P. Pathologic von Willebrand factor degradation with a left ventricular assist device occurs via two distinct mechanisms: Mechanical demolition and enzymatic cleavage. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **149**, 281–289 (2015).
276. Uriel, N. *et al.* Acquired von Willebrand Syndrome After Continuous-Flow Mechanical Device Support Contributes to a High Prevalence of Bleeding During Long-Term Support and at the Time of Transplantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* **56**, 1207–1213 (2010).
277. Netuka, I. *et al.* Evaluation of von Willebrand factor with a fully magnetically levitated centrifugal continuous-flow left ventricular assist device in advanced heart failure. *J. Heart Lung Transplant.* **35**, 860–867 (2016).
278. Nascimbene, A., Neelamegham, S., Frazier, O. H., Moake, J. L. & Dong, J. Acquired von Willebrand syndrome associated with left ventricular assist device. *Blood* **127**, 3133–3141 (2016).
279. Yang, F., Kormos, R. L. & Antaki, J. F. High-speed visualization of disturbed pathlines in axial flow ventricular assist device under pulsatile conditions. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **150**, 938–944 (2015).
280. Kormos, R. L. *et al.* Updated definitions of adverse events for trials and registries of mechanical circulatory support: A consensus statement of the mechanical circulatory support academic research consortium. *J. Heart Lung Transplant.* **39**, 735–750 (2020).

281. Vincent, F. *et al.* Arterial Pulsatility and Circulating von Willebrand Factor in Patients on Mechanical Circulatory Support. *J. Am. Coll. Cardiol.* **71**, 2106–2118 (2018).
282. Netuka, I. *et al.* Initial bridge to transplant experience with a bioprosthetic autoregulated artificial heart. *J. Heart Lung Transplant.* **39**, 1491–1493 (2020).
283. Working Party of The British Transplantation Society. The detection & characterisation of clinically relevant antibodies in allotransplantation. https://bts.org.uk/wp-content/uploads/2016/09/02_BTS_Antibody_Guidelines-1.pdf.
284. Santos-Zas, I. *et al.* Cytotoxic CD8+ T cells promote granzyme B-dependent adverse post-ischemic cardiac remodeling. *Nat. Commun.* **12**, 1483 (2021).
285. Soccal, P. M. *et al.* QUANTIFICATION OF CYTOTOXIC T-CELL GENE TRANSCRIPTS IN HUMAN LUNG TRANSPLANTATION. *Transplantation* **69**, 1923–1927 (2000).
286. Kimball, P. M., Flattery, M., McDougan, F. & Kasirajan, V. Cellular Immunity Impaired Among Patients on Left Ventricular Assist Device for 6 Months. *Ann. Thorac. Surg.* **85**, 1656–1661 (2008).
287. Aburjania, N., Hay, C. M. & Sohail, M. R. Continuous-flow left ventricular assist device systems infections: current outcomes and management strategies. *Ann. Cardiothorac. Surg.* **10**, 233–239 (2021).
288. Amione-Guerra, J. *et al.* Anemia after Continuous-flow Left Ventricular Assist Device Implantation: Characteristics and Implications. *Int. J. Artif. Organs* **40**, 481–488 (2017).
289. Kim, G. H. *et al.* Increased Bleeding Risk in LVAD Patients with Elevated Angiopoetin-2 and TNF- α : Analysis of the PREVENT Multicenter Study. *J. Heart Lung Transplant.* **37**, S71 (2018).
290. Shive, M. S., Salloum, M. L. & Anderson, J. M. Shear stress-induced apoptosis of adherent neutrophils: A mechanism for persistence of cardiovascular device infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6710–6715 (2000).
291. Shive, M. S., Brodbeck, W. G., Colton, E. & Anderson, J. M. Shear stress and material surface effects on adherent human monocyte apoptosis. *J. Biomed. Mater. Res.* **60**, 148–158 (2002).

Annexes: participations techniques à des travaux de l'équipe en rapport avec mon sujet de thèse

7-1 : analyse multimères VWF

Smadja DM, Goudot G, Gendron N, Zarka S, Puymirat E, Philippe A, Spaulding C, **Peronino C**, Tanter M, Pernot M, Messas E. Von Willebrand factor multimers during non-invasive ultrasound therapy for aortic valve stenosis. **Angiogenesis**. 2021 Nov;24(4):715-717.

Philippe A, Chocron R, Gendron N, Bory O, Beauvais A, Peron N, Khider L, Guerin CL, Goudot G, Levasseur F, **Peronino C**, Duchemin J, Brichet J, Sourdeau E, Desvard F, Bertil S, Pene F, Cheurfa C, Szwebel TA, Planquette B, Rivet N, Jourdi G, Hauw-Berlemont C, Hermann B, Gaussem P, Mirault T, Terrier B, Sanchez O, Diehl JL, Fontenay M, Smadja DM. Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. **Angiogenesis**. 2021 Aug;24(3):505-517.

7-2: études A-TAH

Smadja DM, Chocron R, Rossi E, Poitier B, Pya Y, Bekbossynova M, **Peronino C**, Rancic J, Roussel JC, Kindo M, Gendron N, Migliozi L, Capel A, Perles JC, Gaussem P, Ivak P, Jansen P, Girard C, Carpentier A, Latremouille C, Guerin C, Netuka I. Autoregulation of Pulsatile Bioprosthetic Total Artificial Heart is Involved in Endothelial Homeostasis Preservation. **Thromb Haemost**. 2020 Sep;120(9):1313-1322.

Guerin CL, Guyonnet L, Goudot G, Revets D, Konstantinou M, Chipont A, Chocron R, Blandinieres A, Khider L, Rancic J, **Peronino C**, Debuc B, Cras A, Knosp C, Latremouille C, Capel A, Ollert M, Diehl JL, Jansen P, Planquette B, Sanchez O, Gaussem P, Mirault T, Carpentier A, Gendron N, Smadja DM. Multidimensional Proteomic Approach of Endothelial Progenitors Demonstrate Expression of KDR Restricted to CD19 Cells. **Stem Cell Rev Rep**. 2021 Apr;17(2):639-651.

Guyonnet L, Detriché G, Gendron N, Philippe A, Latremouille C, Soret L, Capel A, **Peronino C**, Jansen P, Ivak P, Carpentier A, Mirault T, Netuka I, Guerin CL, Smadja DM. Elevated Circulating Stem Cells Level is Observed One Month After Implantation of Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart. **Stem Cell Rev Rep**. 2021 Dec;17(6):2332-2337.



Von Willebrand factor multimers during non-invasive ultrasound therapy for aortic valve stenosis

David M. Smadja^{1,6} · Guillaume Goudot^{2,3} · Nicolas Gendron^{1,6} · Samuel Zarka^{2,3} · Etienne Puymirat^{3,4} · Aurélien Philippe^{1,6} · Christian Spaulding⁴ · Christophe Peronino¹ · Mickael Tanter⁵ · Mathieu Pernot⁵ · Emmanuel Messas^{2,3}

Received: 22 April 2020 / Accepted: 20 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2021

Dear Editor,

Calcific aortic valve (AV) disease (CAVD) is a major public health concern affecting 2% to 7% of adults over the age of 65 [1]. No pharmacological approach is available and sole effective therapies are surgical AV replacement (SAVR) or transcatheter AV replacement (TAVR). Non-invasive ultrasound therapy (NIUT) has been recently described as a potential new treatment of CAVD *ex vivo* in animal models and in a first in human study [2, 3]. Von Willebrand factor (VWF) is produced by endothelial cells, stored in the form of ultralarge VWF multimers in Weibel–Palade bodies, and then secreted by exocytosis. VWF is a key initiator of the clotting cascade and has the unique feature to mirror the hemodynamic changes applied on the blood flow during cardiac assistance [4–6] and in most of stenotic heart valve diseases and particularly in CAVD [7]. Moreover, VWF has been described to regulate angiogenesis [8]. Thus, lack or dysfunction of VWF has been correlated with systemic malformations of vasculature. The most significant evidence of the link between von Willebrand disease (VWD) and

vascular malformations is angiodysplasia of the gastrointestinal tract in VWD and acquired von Willebrand syndrome [8]. Since aortic valve stenosis is associated to gastrointestinal angiodysplasia, bleeding, and anemia [9], NIUT effect on acquired von Willebrand syndrome potentially at the origin of these effects is a challenging clinical objective.

To better evaluate mechanism and efficacy of NIUT, we characterized VWF multimers in CAVD patients before and 24 h after NIUT. The study was conducted at European George Pompidou Hospital, Paris, France and included four consecutive hospitalized patients. Echocardiographic analysis was performed by an independent core lab (Cardialysis BV, Rotterdam, The Netherlands). Data monitoring and processing of clinical outcomes were performed by an independent clinical research organization (MD Clinicals, Switzerland). A clinical event committee was responsible for adjudicating serious adverse events. All data were recorded in an electronic database. The study was registered in clinicaltrials.gov, number NCT03779620. Blood samples were drawn pre-operatively and 24 h after procedure. All samples were collected on 0.129 M trisodium citrate tubes (9NC Greiner VACUETTE 3.2%). VWF analysis were done on platelet poor plasma (PPP) isolated from citrated tubes. PPP were obtained after centrifugation twice at 2500 g for 15 min. PPP was frozen and stored at -80°C until analysis. VWF antigen (VWF:Ag; STA Liatest, Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, France) and a latex immunoturbidimetric assay (von Willebrand factor ristocetin cofactor activity, VWF:Rco; Diagnostica Stago) were respectively used on a STA-R[®] Max coagulometer (Diagnostica Stago). The VWF multimers pattern was evaluated by a semi-automated assay: the Hydragel 5 von Willebrand multimers kit, used with the Hydrasis 2 Scan instrumentation (Sebia, Lisses, France) as previously described [10]. According to the standard VWF multimers evaluation, the relative proportion of low- (≤ 5 -mers, LMWM), intermediate- (6- to 10-mers, IMWM),

✉ David M. Smadja
david.smadja@aphp.fr

¹ Paris University, Innovative Therapies in Hemostasis, INSERM, F-75006 Paris, France
² Vascular Medicine Department, AP-HP, Paris University, Georges Pompidou European Hospital, 75015 Paris, France
³ UMR 970 PARCC INSERM, Paris University, Paris, France
⁴ Cardiology Department, AP-HP, Paris University, Georges Pompidou European Hospital, 75015 Paris, France
⁵ Physics for Medicine, U1273 INSERM, ESPCI Paris, CNRS, PSL Research University, Paris, France
⁶ Hematology Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, 20 rue Leblanc, F-75015 Paris, France

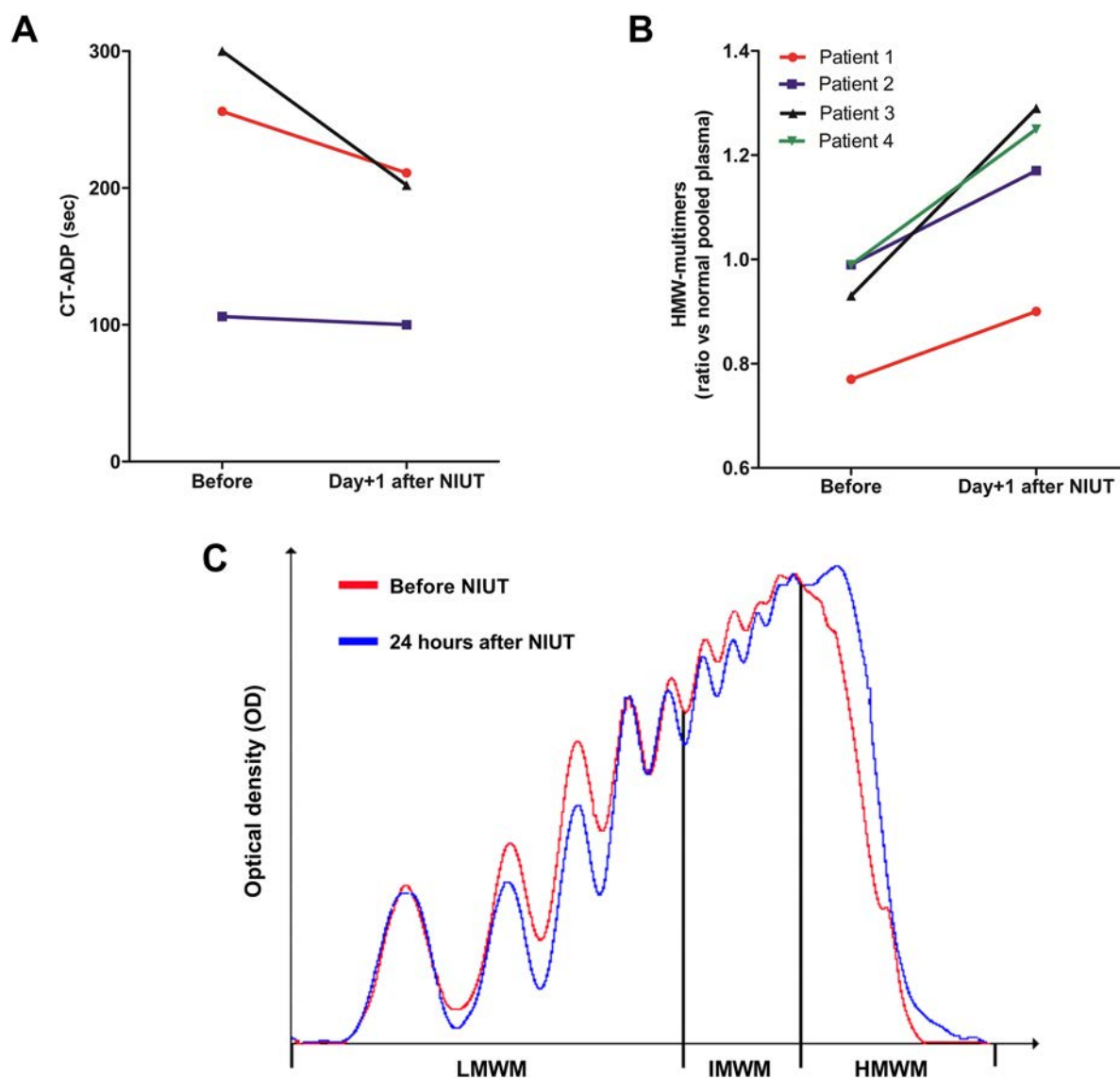


Fig. 1 Time course of high-molecular-weight multimers recovery in patients with CAVD undergoing valvofsoft non-invasive ultrasound therapy (NIUT). **A** Platelet function analyzer-closure time adenine DI-phosphate (PFA-CADP) in patients before and 24 h after NIUT. We observed a decrease in PFA-CADP after NIUT in three patients

explored. **B** Quantitative analysis of HMWM in patients undergoing correction of aortic stenosis by NIUT. HMWM increase in the four CAVD patients explored 24 h after NIUT. **C** Representative time course of von Willebrand factor (VWF) multimeric pattern (with densitometric analysis) in a patient before and after NIUT

and high-molecular-weight (> 10-mers, HMWM) multimers of VWF was determined using densitometry analysis on Hydrasis 2 Scan. Multimers pattern curves were displayed with Sébia Phoresis software. For each patient, LMWM, IMWM, and HMWM were expressed either as a proportion of each patient's total multimers or as a ratio between patient's and healthy volunteers' pooled plasma. Platelet function analyzer-closure time adenine DI-phosphate (PFA-CADP) was assessed by platelet function analyzer PFA-100, (Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) using ADP cartridges (PFA-CADP, normal range, 68–121 s).

We evaluated VWF multimers pattern in four patients before and 24 h after NIUT. Patients (mean age, 91 ± 3 years; 25% women) had severe CAVD (mean AV area, 0.67 ± 0.1 cm²; mean pressure gradient, 40.1 ± 6.8 mmHg) and presented severe comorbidities. NIUT was delivered on the AV transthoracically in all patients using the real-time echo guiding of the device. Mean ultrasound delivery time was 57 ± 5 min and mean calculated acoustic focal energy delivered on the AV was 252 ± 73 J/mm². As planned in the protocol, echocardiography was performed one month after the procedure. Assessment of the AV was performed by transthoracic ultrasound with measurement of the transaortic

pressure gradient by continuous Doppler echocardiography in the apical five-chamber view and by calculation of the AV opening area. At one month, the mean aortic pressure gradient was 28.9 mm Hg vs. 40.1 mm Hg initially, i.e., a decrease of 26% post procedure. Similarly, the mean AV opening area increased from $0.67 \pm 0.13 \text{ cm}^2$ initially to 0.79 cm^2 post procedure, i.e., an increase of 15%. A decrease in PFA-CADP associated with an increase of HMWM was observed the day after the procedure when compared with baseline values (mean PFA-ADP time 220 s vs. 171 s after procedure and mean ratio of HMWM 0.92 vs. 1.16 after procedure). These results are in favor of a restored flow after NIUT procedure confirmed by Doppler echocardiography (Fig. 1).

These results highlight the potential for NIUT to improve AV hemodynamics. Indeed, HMWM of VWF has been largely described as a sensitive sensor of valvular wall shear stress induced by the AV stenosis and associated with paravalvular leak post TAVR [7]. Thus, HMWM of VWF but also PFA-CADP can evaluate in real-time results of NIUT and could be a biomarker of AV recovery and efficacy. Our results need to be confirmed in a larger population and after a long-term follow-up. Moreover, HMWM of VWF but also PFA-CADP during follow-up may help identifying patient's durability of response to this new non-invasive technique to treat CAVD.

Funding This study was funded by Cardiawave[®], Paris, France. It has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under grant agreement No 829492 and was supported by the French Research Consortium STOP-AS, managed by the National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'avenir" with the reference ANR-16-RHUS-0003.

Declarations

Conflict of interest E. Messas, M. Tanter, and M. Pernot are co-founders of Cardiawave[®] and hold shares in the company. All other authors declare having nothing to disclose.

Ethical approval The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committees and the

competent authorities of France. All patients provided written informed consent. <https://www.clinicaltrials.gov>, NCT03779620.

References

1. Durko AP, Osnabrugge RL, Van Mieghem NM, Milojevic M, Mylotte D, Nkomo VT et al (2018) Annual number of candidates for transcatheter aortic valve implantation per country: current estimates and future projections. *Eur Heart J* 39(28):2635–2642
2. Messas E, Remond MC, Goudot G, Zarka S, Penot R, Mateo P et al (2020) Feasibility and safety of non-invasive ultrasound therapy (NIUT) on an porcine aortic valve. *Phys Med Biol*. 65(21):215004
3. Messas E, IJsselmuiden A, Goudot G, Vlieger S, Zarka S, Puymirat E et al (2021) Feasibility and performance of noninvasive ultrasound therapy in patients with severe symptomatic aortic valve stenosis: a first-in-human study. *Circulation*. 143(9):968–70
4. Smadja DM, Saubamea B, Susen S, Kindo M, Bruneval P, Van Belle E et al (2017) Bioprosthetic total artificial heart induces a profile of acquired hemocompatibility with membranes recellularization. *J Am Coll Cardiol* 70(3):404–406
5. Vincent F, Rauch A, Loobuyck V, Robin E, Nix C, Vincentelli A et al (2018) Arterial pulsatility and circulating von willebrand factor in patients on mechanical circulatory support. *J Am Coll Cardiol* 71(19):2106–2118
6. Richez U, De Castilla H, Guerin CL, Gendron N, Luraghi G, Grimme M et al (2019) Hemocompatibility and safety of the carmat total artificial Heart hybrid membrane. *Heliyon*. 5(12):e02914
7. Van Belle E, Rauch A, Vincent F, Robin E, Kibler M, Labreuche J et al (2016) Von Willebrand factor multimers during transcatheter aortic-valve replacement. *N Engl J Med* 375(4):335–344
8. Randi AM, Smith KE, Castaman G (2018) von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood* 132(2):132–140
9. Islam S, Cevik C, Islam E, Attaya H, Nugent K (2011) Heyde's syndrome: A critical review of the literature. *J Heart Valve Dis* 20(4):366–375
10. Philippe A, Chocron R, Gendron N, Bory O, Beauvais A, Peron N, et al. Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality. *Angiogenesis*. 2021.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Circulating Von Willebrand factor and high molecular weight multimers as markers of endothelial injury predict COVID-19 in-hospital mortality

Aurélien Philippe¹ · Richard Chocron² · Nicolas Gendron¹ · Olivier Bory³ · Agathe Beauvais³ · Nicolas Peron⁴ · Lina Khider⁵ · Coralie L. Guerin⁶ · Guillaume Goudot⁵ · Françoise Levasseur¹⁵ · Christophe Peronino¹ · Jerome Duchemin¹³ · Julie Brichet¹ · Elise Sourdeau¹⁴ · Florence Desvard¹ · Sébastien Bertil¹ · Frédéric Pene¹⁶ · Cherifa Cheurfa¹⁷ · Tali-Anne Szwebel¹⁸ · Benjamin Planquette⁷ · Nadia Rivet¹ · Georges Jourdi⁸ · Caroline Hauw-Berlemont⁴ · Bertrand Hermann⁴ · Pascale Gaussem¹ · Tristan Mirault⁹ · Benjamin Terrier¹⁰ · Olivier Sanchez⁷ · Jean-Luc Diehl¹¹ · Michaela Fontenay¹² · David M. Smadja¹

Received: 3 December 2020 / Accepted: 14 December 2020 / Published online: 15 January 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. part of Springer Nature 2021

Abstract

Background Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory disease associated with endotheliitis and microthrombosis.

Objectives To correlate endothelial dysfunction to in-hospital mortality in a bi-centric cohort of COVID-19 adult patients.

Methods Consecutive ambulatory and hospitalized patients with laboratory-confirmed COVID-19 were enrolled. A panel of endothelial biomarkers and von Willebrand factor (VWF) multimers were measured in each patient ≤ 48 h following admission.

Results Study enrolled 208 COVID-19 patients of whom 23 were mild outpatients and 189 patients hospitalized after admission. Most of endothelial biomarkers tested were found increased in the 89 critical patients transferred to intensive care unit. However, only von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) scaled according to clinical severity, with levels significantly higher in critical patients (median 507%, IQR 428–596) compared to non-critical patients (288%, 230–350, $p < 0.0001$) or COVID-19 outpatients (144%, 133–198, $p = 0.007$). Moreover, VWF high molecular weight multimers (HMWM) were significantly higher in critical patients (median ratio 1.18, IQR 0.86–1.09) compared to non-critical patients (0.96, 1.04–1.39, $p < 0.001$). Among all endothelial biomarkers measured, ROC curve analysis identified a VWF:Ag cut-off of 423% as the best predictor for in-hospital mortality. The accuracy of VWF:Ag was further confirmed in a Kaplan–Meier estimator analysis and a Cox proportional Hazard model adjusted on age, BMI, C-reactive protein and D-dimer levels.

Conclusion VWF:Ag is a relevant predictive factor for in-hospital mortality in COVID-19 patients. More than a biomarker, we hypothesize that VWF, including excess of HMWM forms, drives microthrombosis in COVID-19.

Keywords Endothelial activation · COVID-19 · Von Willebrand factor · Multimers · Mortality · Microthrombosis

Introduction

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory disease caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) characterized by an intense inflammatory syndrome associated with a coagulopathy

and has been described as an endothelial disease [1, 2]. Increased D-dimer has been proved to be the most relevant biomarker of the COVID-19-associated coagulopathy [3]. Indeed, a high D-dimer level at the time of patients admission has been reported to be associated with the COVID-19 diagnostic likelihood [4], disease severity, risk of intensive care unit (ICU) referral and mortality [5, 6]. Moreover, we recently proposed that in COVID-19, D-dimer levels reflect pulmonary microvascular thrombosis at the origin of right ventricle dysfunction [7]. Autopsy case series confirmed the hypothesis that both endothelial inflammation

✉ David M. Smadja
david.smadja@aphp.fr

Extended author information available on the last page of the article

and microvascular thrombosis are prominent in the pulmonary, renal and intestinal vasculature. This microthrombotic process has been described as closely related to endothelial lesions characterized by endotheliitis [8], abnormal angiogenesis in lungs [9] and also an increase in circulating endothelial cells (CECs) in COVID-19 patients [4, 10]. This endothelial injury is probably the result of a combination of SARS-CoV-2 direct entry in endothelial cells (ECs) [8], the subsequent prothrombotic phenotype of ECs and the surrounding tissue collateral damage secondary to cytokine release and complement-system activation [11, 12]. In line, we recently described an association between plasma angiopoietin-2 (Ang2) levels at admission and COVID-19 patients referral to the ICU [13]. However, the precise pathogenesis of endothelial injury and its deleterious consequences in COVID-19 are still elusive and a better understanding of these processes could help physicians, especially in the ICU, to determine the appropriate therapeutic strategies for preventing and treating coagulopathy associated with endothelial damage.

The objective of the present study was to assess to what extent endothelial activation biomarkers measured at admission were predictive of in-hospital mortality in a large cohort of 208 adult COVID-19 patients.

Materials and methods

Study design and population

We performed a bi-centric cross-sectional study of adult (≥ 18 -years old) COVID-19 hospitalized and ambulatory patients in two French hospitals (European Georges Pompidou Hospital and Cochin-Hotel Dieu Hospital, Paris, France) between March 13 and June 26, 2020. The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki and a written consent form was signed by all patients included or their trusted relatives at the time of enrollment (SARCODO 2020-A01048-31A, NCT04624997). All included patients, hospitalized or not, presented a confirmed diagnosis of COVID-19, using a reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) assay on nasopharyngeal swab samples (Allplex™ 2019-nCoV Assay, Seegene, Seoul, South Korea) as previously described [14]. Data were automatically analyzed using Seegene viewer software.

Patients were classified according to World Health Organization guidance (WHO) as non-critical (median oxygen requirement 3 l/min; WHO score range 4–7) or critical (requiring mechanical ventilation, WHO score range 8–9) in the first 48 h following admission for clinically suspected COVID-19. Outpatients were COVID-19 patients who met no hospitalization criteria and returned home immediately after RT-PCR testing for COVID-19 diagnosis. None of the

outpatients required supplemental oxygen, were later hospitalized or died in the month following COVID-19 diagnosis. Finally, we also included 29 non-COVID-19 non-hospitalized individuals who served as controls. These patients had an initial clinical suspicion of COVID-19, but with mild clinical presentation and a negative RT-PCR result.

Patient characteristics including age, sex, comorbidities, medical history and treatment at admission were recorded. The primary outcome was COVID-19 in-hospital mortality.

Laboratory procedures on admission

Routine laboratory tests and sampling for an extensive panel of endothelial activation biomarkers were all performed at hospital admission i.e. in the first 48 h following the admission for suspected COVID-19. Venous blood was collected from patients and controls and processed according to standard laboratory techniques. Routine laboratory tests were plasma creatinine, C-reactive protein (CRP) and high-sensitivity cardiac troponin I (Hs-cTnI) conducted on a DXI analyzer (Beckman Coulter, Brea, CA). Regarding coagulation assays and endothelial biomarker measurements, blood was collected in 0.129 M trisodium citrate tubes (9NC BD Vacutainer, Plymouth, UK). Platelet-poor plasma (PPP) was obtained after centrifugation twice at $2500\times g$ for 15 min and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Measurement of D-dimer was performed using the Vidas D-dimers® assay (Biomérieux, Marcy-Etoile, France) according to the manufacturer's instruction. The plasma concentrations of soluble E-selectin (sE-sel), soluble endoglin (sEng), angiopoietin-1 (Ang1), Ang2 and vascular cell adhesion protein 1 (VCAM-1) were quantified in PPP using a Human Magnetic Luminex Assay (R&D Systems, Minneapolis, MN). Data were assessed with the Bio-Plex 200 using the Bio-Plex Manager 5.0 software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Soluble thrombomodulin (sTM, DTHBD0, R&D Systems) and soluble endothelial protein C receptor (sEPCR, 00264, Diagnostica Stago, Asnières, France) were measured using ELISAs on plasma samples according to the manufacturer's recommendations.

CECs were isolated and counted by immunomagnetic separation using anti-CD146 monoclonal-antibody-coated beads and marking reagent acridin orange as previously described [4].

Von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) and activity (VWF:Rco) used (STA Liatest, Diagnostica Stago) and a latex immunoturbidimetric assay (vWF:Rco; Diagnostica Stago), respectively, on a STA-R® Max coagulometer (Diagnostica Stago). The VWF multimers pattern was evaluated by a semi-automated assay: the Hydrigel 5 von Willebrand multimers kit, on the Hydrasis 2 Scan instrumentation (Sebia, Lisses, France) [15, 16]. All samples were defrozen in a water bath at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, were treated with

the appropriate sample diluent and incubated for 20 min at 45 °C. The dilution ratio was adapted to adjust all patients' samples to 100% VWF:Ag. The treated plasma samples were loaded onto Hydrigel 5 von Willebrand multimers gels (5 µl/well) for migration by agarose gel electrophoresis. Direct immunofixation by anti-VWF antibodies and visualization by peroxidase-labeled antibodies revealed the multimeric profile. According to a standard VWF multimers evaluation [17], the relative proportions of low- (≤ 5 -mers, LMWM), intermediate- (6- to 10-mers, IMWM), and high-molecular-weight multimers (> 10 -mers, HMWM) of VWF were determined using densitometry analysis on a Hydrasis 2 Scan. Multimers pattern curves were displayed on the Sebia Phoresis software. For each patient, LMWM, IMWM and HMWM were either expressed as a proportion (expressed in percentage) of each patient's total multimers or as a ratio between patient's and healthy volunteers' pooled plasma.

Statistical analysis

Continuous data were expressed as median (interquartile range (IQR)) and categorical data as proportions. In the univariate analysis, patients were compared according to COVID-19 status (non-COVID-19 vs COVID-19) and COVID-19 severity (non-critical vs critical) using the Mann–Whitney test and Fisher's exact test for continuous and categorical variables, respectively. The association between levels of endothelial activation biomarkers and COVID-19 severity was assessed using the Kruskal–Wallis and Cochran–Armitage tests for trends for continuous and categorical variables (multiple groups), respectively. In order to estimate the ability of VWF:Ag to predict in-hospital mortality, we used receiver operator characteristics (ROC) analysis. We estimated the area under the curve (AUC) and its 95% confidence interval (CI) and selected the optimal cutoff that illustrated the prognostic ability of VWF:Ag.

In the multivariate analysis, we assessed the association between VWF:Ag and in-hospital mortality using the logistic regression model adjusted for age, body mass index (BMI), D-dimer and CRP levels.

For the survival analysis among patients hospitalized for COVID-19, the start of the study was triggered by the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. The end of the study was defined either by patient's death during their hospitalization or by discharge alive from the hospital. We used the Kaplan–Meier curve to estimate the survival function from diagnosis to in-hospital death according to the optimal cutoff of VWF:Ag. Survival curves were compared using the log-rank test. We used the Cox proportional hazard (PH) model adjusted for age, BMI, D-dimer and CRP levels to investigate the relationships between the increase in VWF:Ag (over the calculated cut-off value) and in-hospital mortality.

All analyses were two-sided and a p -value of < 0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analysis was performed using R studio software including R version 3.6.3 (RStudio, PBC, Boston, MA).

Results

Study population

Between March 13 and June 26, 2020, a total of 208 COVID-19 adult patients comprising 23 outpatients and 185 hospitalized patients were included in this study. Among hospitalized patients at admission, 89 (48.1%) suffering from critical forms of COVID-19 were under mechanical ventilation (MV) in the ICU, whereas 96 (51.9%) were hospitalized in medical wards. Among the patients included, 129 (62.0%) were male. The non-COVID-19 control group comprised 17 (58.6%) females and 12 (41.4%) males. The median age was 39 (IQR 32.0–46.0) in the non-COVID-19 group and 62 (50.0–72.0) in COVID-19 patients. Patients were significantly older ($p < 0.001$) and included a higher proportion of males ($p < 0.001$) than non-COVID-19 patients (Table 1). Compared with the non-COVID-19 group, cardiovascular risk factors were more frequent in COVID-19 patients, especially in those who were hospitalized. Indeed, 105 (50.5%) COVID-19 patients suffered from hypertension, while obesity, hyperlipidemia and diabetes were found in approximately one third of them. Concerning hospitalized COVID-19 patients, critical and non-critical patients did not significantly differ for most clinical and biological characteristics; however, critical patients had a higher median BMI (28.1, IQR 26.0–33.7) than non-critical patients (24.4, 23.2–28.5, $p < 0.001$). Furthermore, critical patients had significantly higher D-dimer, Hs-cTnI and CRP levels ($p < 0.001$ for each) than non-critical patients.

Endothelial activation biomarkers are associated with COVID-19 severity

First, CECs were significantly increased in critical (median, 32.0, IQR 17.0–55.5) COVID-19 patients compared with non-critical patients (15.0, 9.00–28.50, $p < 0.001$) (Fig. 1a, Table 2). In contrast, Ang1, sEng and sEPCR levels were not significantly different between COVID-19 and non-COVID-19 patients (Fig. 1b–d). Compared to the non-COVID-19 group, levels of sVCAM-1 were increased significantly in non-critical and critical COVID-19 patients without no significant difference between these two groups (critical: median 2935 ng/ml IQR 1830–5646, non-critical: 2272 ng/ml, 1068–4239, $p = 0.77$) (Fig. 1e). Levels of sE-sel (critical: median 42879 pg/ml, IQR 32136–65398, non-critical: 22453 pg/ml, 17873–28643, $p < 0.0001$), sTM

Table 1 Demographic, clinical and biological characteristics of COVID-19 and non COVID-19 patients at admission

	Non-COVID-19 (<i>n</i> = 29)	COVID-19 patients			<i>p</i> -value
		Outpatients (<i>n</i> = 23)	Non-critical (<i>n</i> = 96)	Critical (<i>n</i> = 89)	
Male sex— <i>n</i> (%)	12 (41.4)	9 (39.1)	55 (57.3)	65 (73.0)	0.002
Age—years median (IQR)	39.0 [32.0–46.0]	40.0 [34.0–46.5]	65.5 [55.0–76.0]	62.0 [51.0–71.0]	<0.001
BMI—kg/m ² median (IQR)	24.5 [22.1–28.1]	23.3 [21.6–24.6]	24.4 [23.2–28.5]	28.1 [26.0–33.7]	<0.001
Delay between first symptoms and hospitalization—days median (IQR)	–	–	7.0 [5.0–10.3]	7.0 [5.0–10.0]	0.77
Comorbidities					
Obesity— <i>n</i> (%)	5 (17.2)	0 (0.0)	18 (18.8)	33 (37.1)	<0.001
Hypertension— <i>n</i> (%)	4 (13.8)	2 (8.7)	53 (55.2)	50 (56.2)	<0.001
Hyperlipidaemia— <i>n</i> (%)	0 (0.0)	2 (8.7)	21 (21.9)	30 (33.7)	<0.001
Diabetes— <i>n</i> (%)	1 (3.4)	0 (0.0)	23 (24.0)	31 (34.8)	<0.001
Chronic kidney disease— <i>n</i> (%)	1 (3.4)	0 (0.0)	9 (9.4)	13 (14.6)	0.10
Active or history of malignancy— <i>n</i> (%)	0 (0.0)	2 (8.7)	18 (18.8)	11 (12.4)	0.057
Coronary artery disease or myocardial infarction— <i>n</i> (%)	2 (6.9)	1 (4.3)	9(9.4)	8 (9.0)	0.35
Stroke or transient ischaemic attack— <i>n</i> (%)	1 (3.4)	0 (0.0)	3 (3.1)	7 (7.9)	0.28
Asthma— <i>n</i> (%)	1 (3.4)	3 (13.0)	8 (8.3)	3 (3.4)	0.25
History of VTE— <i>n</i> (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (3.1)	8 (9.0)	0.52
Biological parameters					
D-dimer—ng/ml median [IQR]	214 [172–291]	295 [140–438]	1089 [798–1889]	4186 [2498–7292]	<0.001
CRP—mg/l median [IQR]	–	28.0 [14.8–33.4]	63.6 [32.0–117.9]	189.1 [121.5–259.9]	<0.001
Plasma creatinine—μmol/l median [IQR]	–	64.00 [64.0–64.0]	68.0 [56.5–83.5]	102.0 [72.6–214.3]	<0.001
Hs-cTnI—ng/l median [IQR]	6.8 [5.6–9.1]	7.2 [5.6–8.8]	8.1 [5.0–15.1]	28.80 [15.3–51.7]	<0.001
Outcomes					
MV— <i>n</i> (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (4.2)	89 (100.0)	<0.001
In-hospital mortality— <i>n</i> (%)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (2.1)	39 (43.8)	<0.001
Length of hospitalization—days median [IQR]	–	–	8.5 [5.0–16.0]	26.0 [15.0–39.0]	<0.001

IQR interquartile range, BMI body mass index, CRP C-reactive protein, VTE venous thromboembolism, Hs-cTnI high-sensitivity cardiac troponin I, MV mechanical ventilation obesity was defined as BMI > 30 kg/m²

(critical: median 636 pg/ml, IQR 499–871, non-critical: 343 pg/ml, 298–412, $p < 0.0001$), Ang2 (critical: median 5360 pg/ml, IQR 4244–9776, non-critical: 2022 pg/ml, 1363–2663, $p < 0.0001$), were significantly increased only in critical COVID-19 patients. In outpatients and non-critical COVID-19 patients in medical wards, circulating levels of these endothelial biomarkers circulating levels did not significantly differ from non-COVID-19 patients. (Fig. 1f–h).

In contrast to the abovementioned biomarkers, VWF:Ag levels scaled along with COVID-19 severity. Levels of VWF:Ag levels were significantly higher in all COVID-19 patients (median 367%, IQR 250–487) compared with non-COVID-19 patients (113%, 91–152, $p < 0.0001$). Furthermore, VWF:Ag levels were significantly higher in critical patients (median 507%, IQR 428–596) in contrast to non-critical patients (288%, 230–350, $p < 0.0001$) and were significantly higher in non-critical patients (288%, 230–350)

in contrast to COVID-19 outpatients (144%, 133–198, $p = 0.007$, Fig. 1i). In terms of the association of endothelial markers and usual parameters of severity, VWF:Ag levels were the parameter most significantly associated with D-dimer levels ($r = 0.794$ $p < 0.0001$), CRP ($r = 0.585$ $p < 0.001$) and troponin I ($r = 0.550$ $p < 0.0001$). As expected, levels of VWF:Ag were strongly correlated with those of VWF:Rco ($r = 0.944$, $p < 0.001$, data not shown).

Following the observation that increased VWF:Ag in COVID-19 patients mirrored clinical severity, we next explored VWF involvement in COVID-19, performing VWF multimer analysis in both randomly generated subgroups of 40 critical and 37 non-critical included patients. No significant difference was observed in IMWM, while a significant decreased in LMWM was observed (Fig. 2a, b). Strikingly, VWF HMWM (ratio) were significantly increased in critical patients (median 1.18, IQR 1.04–1.39) compared to

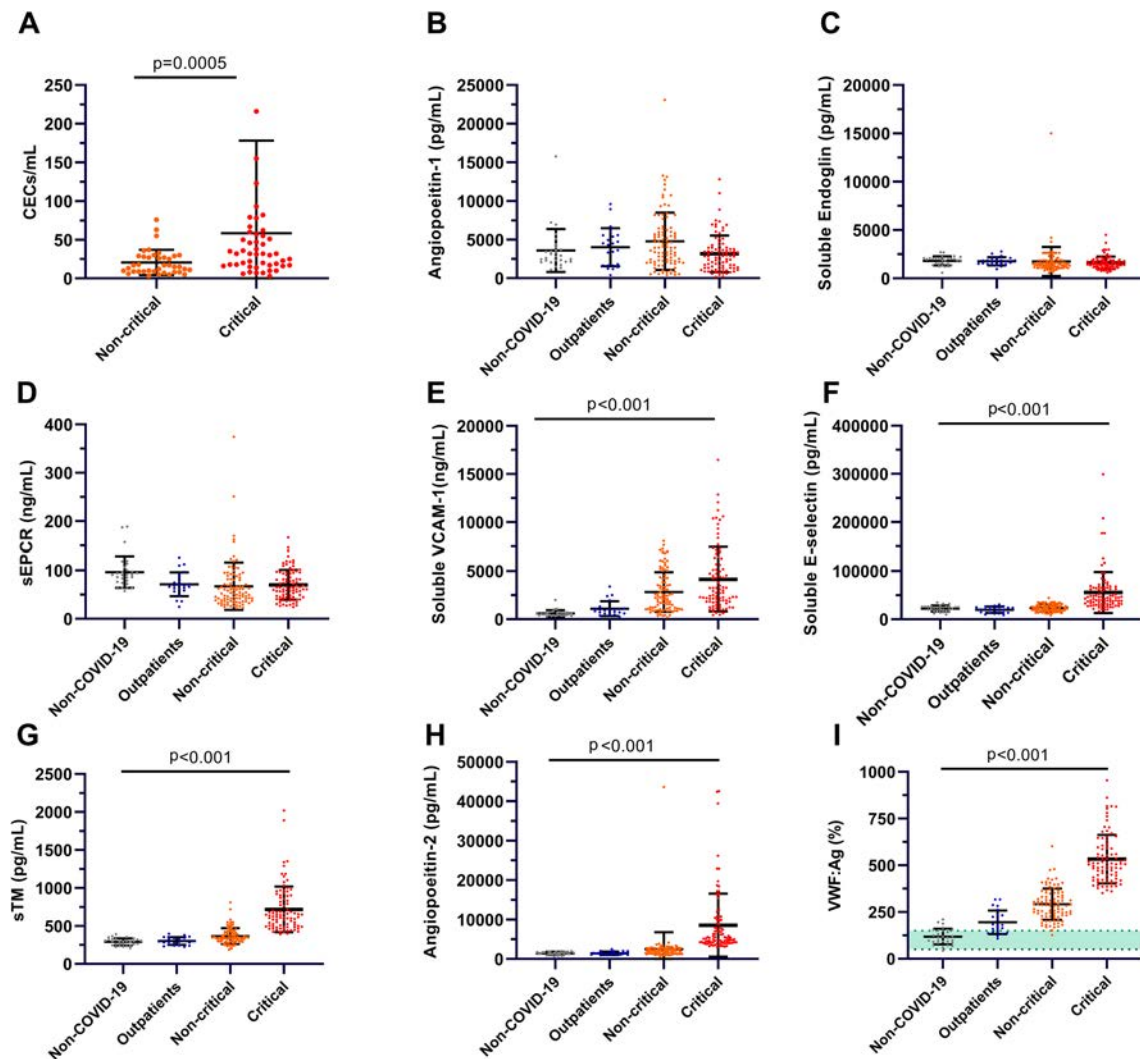


Fig. 1 Levels of endothelial activation biomarkers according to critical patients, non-critical patients, outpatients, and non-COVID-19 individuals. Datapoints indicate individual measurements, whereas horizontal bars represent the means with standard deviations. Green shaded areas indicate the normal ranges of values. *p*-value comes from the Mann–Whitney for comparison between two groups and the Kruskal Wallis test for comparison between the four groups. **a** Measurement of circulating endothelial cells (CECs) in 37 critical

and 40 non-critical COVID-19 patients at admission. Plasma levels of angiopoietin-1 (**b**), soluble endoglin (**c**), soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) (**d**), soluble vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) (**e**), soluble E-selectin (**f**), sTM (soluble thrombomodulin) (**g**), angiopoietin-2 (**h**), von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) (**i**) in 89 critical and 96 non-critical COVID-19 outpatients and 29 non-COVID-19 individuals at admission

non-critical patients (0.96, 0.86–1.09, *p* < 0.001, Fig. 2c, d), in line with the decreased LMWM.

VWF is the best endothelial biomarker to predict in-hospital mortality in COVID-19

Subsequently, we further investigated the association between the levels of endothelial biomarkers at admission and in-hospital mortality. First, we performed a univariate logistic regression model for all endothelial biomarkers measured. In decreasing order, variations in levels of HMWM (ratio) (odds ratio, OR 116, 95% CI 10.2–1943,

p < 0.001), HMWM (%) (OR 1.11, 95% CI 1.00–1.24, *p* = 0.048), vWF:Ag (OR 1.01, 95% CI 1.01–1.02, *p* < 0.001) and sTM (OR 1.01, 95% CI 1.01–1.01, *p* < 0.001) were the most significantly associated with in-hospital mortality (Table 2). In order to evaluate the respective discriminatory ability between survivors and non survivors of those four biomarkers, we generated ROC curves. Among generated ROC curves in hospitalized patients, VWF:Ag (AUC 0.92, 95% CI 0.88–0.96) proved to be the best predictive parameter followed by sTM (0.91, 95% CI 0.87–0.95), HMWM (as a ratio vs normal plasma: 0.77, 95% CI 0.64–0.90, as a percentage 0.64, 95% CI 0.49–0.79) (Fig. 3). Therefore, we

Table 2 Admission level and univariate outcome association of endothelial biomarkers and von Willebrand factor-related parameters of COVID-19 and non-COVID-19 patients

	Non-COVID-19 (n = 29)	COVID-19 patients			p-value	Univariate association with mortality OR (95% CI, p-value)
		Outpatients (n = 23)	Non-critical (n = 96)	Critical (n = 89)		
Days between admission and laboratory measurements—median [IQR]	–	–	1.0 [1.0–2.0]	1.00 [1.00–2.00]	0.78	–
Endothelial biomarkers						
CECs/ml median [IQR]	–	–	15.0 [9.0–28.5]	32.0 [17.0–55.5]	0.001	1.01 (1.00–1.03, p = 0.092)
Angiopietin-2—pg/ml median [IQR]	1489 [1155–1753]	1329 [1091–1674]	2022 [1363–2663]	5360 [4244–9776]	<0.001	1.00 (1.00–1.00, p < 0.001)
Soluble E-selectin—pg/ml median [IQR]	23914 [17737–26318]	20787 [13938–25159]	22453 [17873–28643]	429879 [32136–65398]	<0.001	1.00 (1.00–1.00, p < 0.001)
sTM—pg/ml median [IQR]	296 [257–320]	312 [298–333]	343 [298–412]	636 [499–871]	<0.001	1.01 (1.01–1.01, p < 0.001)
Soluble VCAM-1—ng/ml (median [IQR])	518 [408–670]	918 [649–1097]	2272 [1068–4239]	2935 [1830–5646]	<0.001	1.00 (1.00–1.00, p < 0.001)
Angiopietin-1—pg/ml median [IQR]	3227 [2150–3689]	3800 [1634–5467]	3961 [2108–6064]	2947 [1341–3741]	0.009	1.00 (1.00–1.00, p = 0.012)
Soluble endoglin—pg/ml median [IQR]	1921 [1489–2095]	1736 [1496–1946]	1301 [1088–1552]	1489 [1186–1857]	0.052	1.00 (1.00–1.00, p = 0.991)
sEPCR—ng/ml median [IQR]	71.7 [68.5–89.2]	68.3 [60.2–81.9]	54.1 [38.1–82.2]	64.3 [45.1–93.7]	0.31	1.00 (0.99–1.01, p = 0.91)
VWF-related parameters						
VWF:Ag—% median [IQR]	113 [91–152]	144 [132–198]	288 [230–350]	507 [428–596]	<0.001	1.01 (1.01–1.02, p < 0.001)
VWF:Rco—% median [IQR]	96 [73–119]	122 [95–161]	231 [174–276]	399 [333–537]	<0.001	1.01 (1.01–1.01, p < 0.001)
VWF:Rco/VWF:Ag—Ratio median [IQR]	0.83 [0.80–0.86]	0.80 [0.71–0.84]	0.81 [0.72–0.90]	0.77 [0.66–0.91]	0.16	0.16 (0.02–1.51, p = 0.11)
LMWM—% median [IQR]	–	–	42.1 [39.2–44.7]	38.40 [36.7–42.2]	0.004	0.94 (0.85–1.03, p = 0.21)
LMWM—ratio median [IQR]	–	–	1.09 [1.03–1.16]	1.00 [0.85–1.12]	0.20	0.01 (0.00–0.22, p = 0.007)
IMWM—% median [IQR]	–	–	31.9 [30.6–33.0]	30.90 [29.3–32.3]	0.26	0.92 (0.75–1.12, p = 0.43)
IMWM—ratio median [IQR]	–	–	0.92 [0.85–0.98]	0.90 [0.84, 0.94]	0.005	0.23 (0.00–46.60, p = 0.60)
HMWM—% median [IQR]	–	–	26.5 [25.1–28.3]	29.80 [25.6–34.1]	<0.001	1.11 (1.00–1.24, p = 0.048)
HMWM—ratio median [IQR]	–	–	0.96 [0.86–1.09]	1.18 [1.04–1.39]	0.004	116 (10.2–1943 p < 0.001)

IQR interquartile range, OR odds ratio, CI confidence interval, CECs circulating endothelial cells, sTM soluble thrombomodulin, VCAM-1 vascular cell adhesion molecule 1, sEPCR soluble endothelial protein C receptor, VWF:Ag von Willebrand factor antigen, vWF:Rco von Willebrand factor ristocetin cofactor activity, LMWM von Willebrand factor low-molecular weight multimers, IMWM von Willebrand factor intermediate-molecular weight multimers, HMWM von Willebrand factor high-molecular weight multimers

used the ROC curve of VWF:Ag to estimate a cut-off value to predict in-hospital mortality. A VWF:Ag level at 423% provided an optimal sensitivity–specificity balance with an acceptable sensitivity of 95.1% (95% CI 88.0–99.1) associated with an excellent negative predictive value of 98.7% (95% CI 95.1–99.8) to predict in-hospital mortality.

Indeed, in a univariable analysis model a VWF:Ag level over 423% at admission was significantly associated with higher in-hospital mortality (OR 89.7 95% CI 25.9–567.4, $p < 0.001$). This association remained significant in a multivariable analysis model adjusted on age, BMI, D-dimer and CRP (OR 25.6, 95% CI 5.6–198.2, $p < 0.001$) (Table 3).

This ability of the vWF:Ag cut-off to predict in-hospital mortality was additionally validated in a Kaplan–Meier estimator ($p < 0.001$, Fig. 4) and a Cox proportional hazard analysis adjusted for age, BMI, D-dimer and CRP (Hazard ratio, HR 9.46, 95% CI 1.99–44.9, $p = 0.005$, Fig. 5).

Discussion

In this study, we demonstrated that markers of endothelial injury in COVID-19 patients were related to severity of patients at admission and to in-hospital mortality. To our knowledge, this study is the first one to examine an extensive panel of endothelial circulating biomarkers, including the assessment of circulating endothelial cells, soluble markers and VWF multimers patterns in such a range of COVID-19 severities, from mildly symptomatic outpatients to critically ill patients, in a cohort of this scale and a non-COVID-19 control group. The best predictive marker of in-hospital mortality was found to be VWF:Ag, which makes relevant its evaluation in daily practice during COVID-19 hospitalization.

First of all, we confirmed that an endothelial dysfunction occurs in COVID-19, in particular in severe forms. Previously, our team demonstrated an association between Ang2 levels at admission and ICU referral [13]. Moreover, Goshua et al. showed that sTM levels measured in critical COVID-19 patients were increased and were a good predictor of in-hospital mortality [18]. Recently, Cugno et al. reported increased levels of sTM and sE-sel in severe COVID-19 patients without establishing their relationship to in-hospital mortality [19]. In the present study, we found an increase in several specific biomarkers of EC injury in COVID-19 patients compared with non-COVID-19 individuals, the most striking differences being observed in VWF:Ag. Notably, we identified two distinctive profiles of biomarkers according to clinical severity. Indeed, Ang2, sE-sel and sTM were elevated only in critical patients, whereas only VWF:Ag increased accordingly to disease severity. Von Willebrand factor, which mediates platelet adhesion and aggregation through its binding to platelet GPIIb/IIIa receptor,

is contained in endothelial Weibel–Palade bodies (WBPs), mainly in the form of large multimers [20]. Inflammatory cytokines, in particular interleukin 1 and tumor necrosis factor α , were shown to trigger endothelium activation which results notably into the release of endothelial WBPs content and therefore VWF by exocytosis [21]. As expected, in our cohort, VWF:Ag levels correlated with inflammatory markers such as CRP. To date, the only therapy which has demonstrated clinical proofs on in-hospital mortality in COVID-19 is steroids, reducing deaths by approximately one-third among critically-ill patients [22]. In addition to well-known systemic anti-inflammatory effects, steroids exert various direct effects on EC. Indeed, steroids inhibit endothelial phenotype induced by inflammation [23–25] and improve endothelial barrier integrity through upregulation of junctional proteins such as occludin, claudin-5, and VE-cadherin [26]. Thus, steroids could decrease excessive endothelium activation and subsequent VWF release which could explain, at least partly, their clinical beneficial in COVID-19. Future studies need to appreciate endothelial lesion markers, in particular VWF, as prognostic marker during steroids treatment. However, in the present study, VWF:Ag remained independently associated with in-hospital mortality after adjustment for inflammatory biomarkers, which supports the hypothesis of additional causes of VWF secretion by ECs. Indeed, endothelium is emerging as a key target organ of SARS-CoV-2 infection. Dissociation between markers of activation, such as sE-sel, and VWF:Ag in critical and non-critical patients could reflect the overwhelming synthesis and release of VWF in pulmonary vasculature due to a combination of inflammation, direct viral destruction of ECs, and also lung tissue hypoxia [27].

In order to deepen the characterization of VWF involvement in COVID-19, we reported increased HMWVW in critical compared with non-critical patients. Following an initial endothelial lesion caused by multiple factors, an increase in HMWVW of VWF could promote local microthrombosis which itself promotes additional ECs lesion in a vicious cycle. Indeed, under physiological conditions, newly secreted VWF multimers are rapidly cleaved into smaller, less reactive multimers by the metalloproteinase ADAMTS13 during VWF secretion from ECs [28]. ADAMTS13 acquired deficiency also known as thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), is a life-threatening condition well known to induce an accumulation of large VWF multimers which binds spontaneously to platelets, resulting in diffuse microthrombosis [29]. In a small case series, Escher et al. reported normal ADAMTS13 activity in severe COVID-19 patients [30], whereas Rovas et al. found a minor decrease in ADAMTS13 in critically-ill patients but in no way comparable to the nearly total deficiency associated with TTP [31]. Taken together, our results suggest a massive release of unprocessed VWF from activated ECs that may

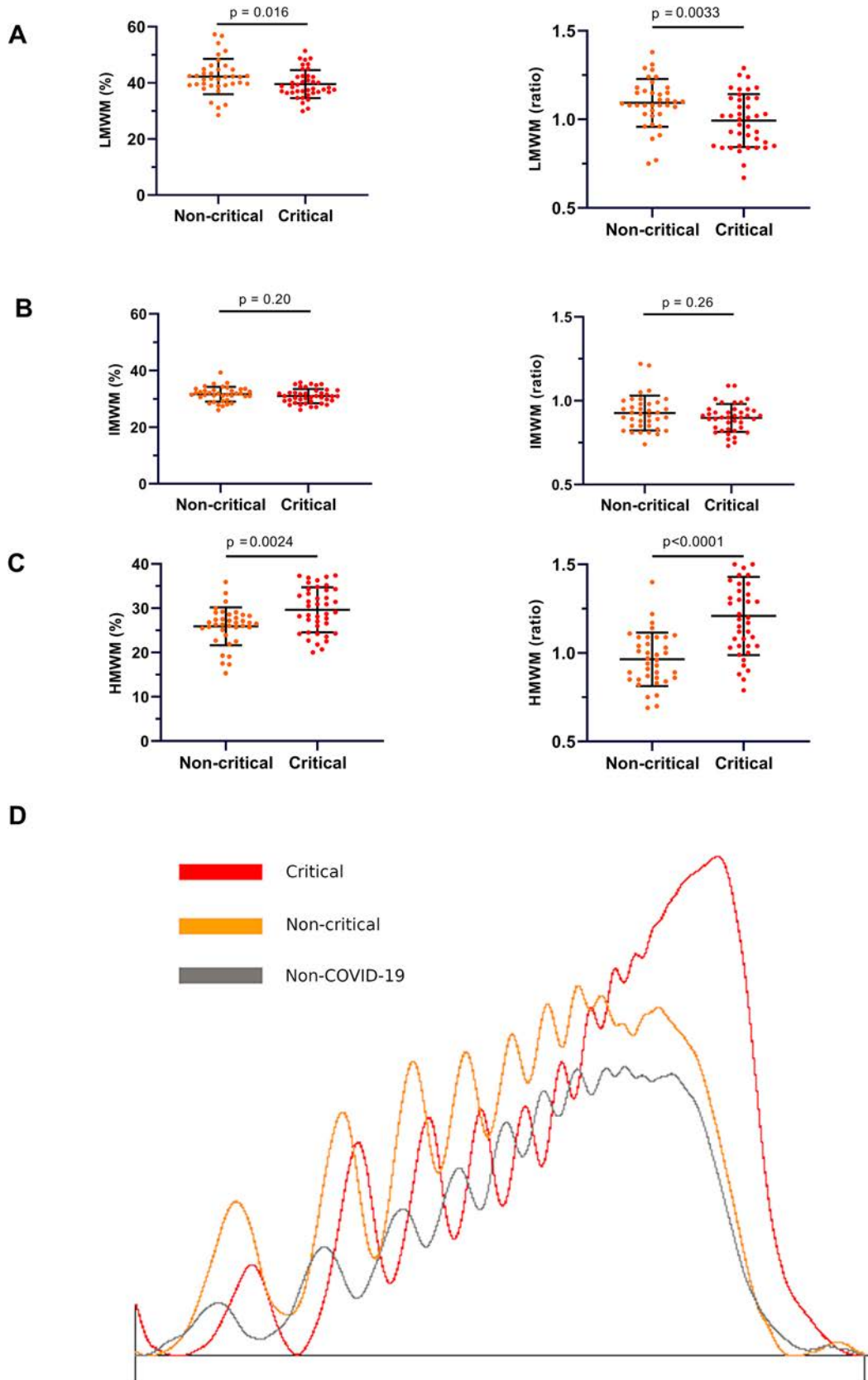


Fig. 2 Comparisons of von Willebrand factor multimers pattern in 40 critical and 37 non-critical COVID-19 patients. Datapoints indicate individual measurements, whereas horizontal bars show mean with standard deviation. P-value comes from the Mann–Whitney test for comparison between the two groups. **a** Low molecular weight multimers (LMWM) expressed as a percentage of total multimer (left panel) or a ratio compared to healthy individuals’ pool of plasma (right panel). **b** Intermediate molecular weight multimers (IMWM) expressed as a percentage of total multimers (left panel) or a ratio compared to healthy individuals’ pool of plasma (right panel). **c** High molecular weight multimers (HMWM) expressed as a percentage of total multimers (left panel) or a ratio compared with healthy individuals’ pool of plasma (right panel). **d** Curves showing Von Willebrand factor multimers pattern analysed in densitometric analysis of one critical COVID-19 patient, one non-critical COVID-19 patient and one non-COVID-19 individual. HMWM are located at the right part of each curves. (Refer to materials and methods for detailed multimers classification)

overwhelm the enzymatic capacity of ADAMTS13 rather than a true ADAMTS13 deficiency. In COVID-19, this link between VWF and pulmonary microthrombosis requires further confirmation. A way to highlight this link could be measuring VWF:Ag at multiple time points during the hospitalization of severe COVID-19 patients and evaluate its correlation with advanced respiratory monitoring parameters established to mirror the pulmonary microcirculation dysfunction such as pulmonary physiological dead space and its sub-components airway dead-space and alveolar dead-space [32, 33].

Regarding clinical practice, in light of our finding that VWF:Ag levels at the time of COVID-19 patients’ aggravation (approximated in this study by hospitalization) might predict in-hospital mortality, we recommend including systematic VWF:Ag measurement into the monitoring strategy of all COVID-19 patients. In addition, it will be very important to investigate VWF:Ag follow-up, which could provide additional prognostic information both in the critical care and in the non-critical care settings. This strategy should be all the easier to set up, given that VWF:Ag is a common analysis in hematology laboratory in most healthcare centers worldwide [34].

Furthermore, establishing a well-validated VWF:Ag cut-off could help in identifying patients who might benefit the most from adjunction of antiplatelet therapies to standard of care. Indeed, VWF and, in particular, HMWM, is an essential component in platelet aggregation. Manne et al. and Hottz et al. both highlighted platelet hyperactivity in COVID-19-associated pathophysiology [35, 36]. Aspirin could present a way to hinder microthrombosis in COVID-19 and therefore to stop the vicious cycle of endothelial

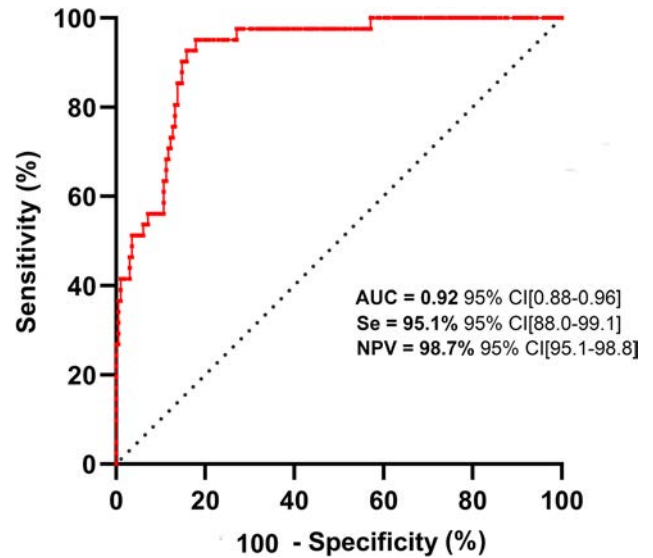


Fig. 3 Receiver operating curves evaluating unadjusted von Willebrand factor antigen’s ability to predict in-hospital-mortality. The diagonal black dotted segment is the reference line. *AUC* area under the curve, *Se* sensitivity, *NPV* negative predictive value, *CI* confidence interval

lesion described above. In the pre-COVID-19 era, several single-center retrospective observational cohort studies assessed a possible association between pre-hospital anti-platelet agent (the vast majority of which is aspirin) therapy and mortality in sepsis or acute respiratory distress syndrome (ARDS). Patients admitted with community-acquired pneumonia on anti-platelet therapy have a lower admission rate to the ICU and shorter hospital stay [37]. In a general population of ICU admissions, patients with pre-admission antiplatelet therapy had a decreased risk of developing ARDS [38, 39] and multi-organ failure [40]. Furthermore, in ICU patients with septic shock or ARDS being treated with antiplatelet drugs, several studies reported a reduction in mortality rate [41–43]. In COVID-19, Chow et al. recently showed in a retrospective observational cohort study of adult patients admitted with COVID-19 that patients who received aspirin within 24 h of admission or seven days prior to admission displayed a decreased risk of MV, ICU admission and in-hospital mortality with no differences in major bleeding or overt thrombosis between aspirin users and aspirin non-users [44]. Aspirin therefore appears to be a promising treatment in COVID-19, although it should be further evaluated in prospective clinical trials. Another attractive approach to

Table 3 Unadjusted and adjusted logistic regression analyses of von Willebrand factor antigen levels as a predictive factor for COVID-19 in-hospital mortality

		Logistic regression model with in-hospital mortality as the outcome	
		Univariate analysis OR (95% CI, <i>p</i> -value)	Multivariate analysis OR (95% CI, <i>p</i> -value)
VWF:Ag (%)	< 423	–	–
	> 423	89.7 (25.9–567.4, <i>p</i> < 0.001)	25.6 (5.6–198.2, <i>p</i> < 0.001)
Age (years)*	< 59	–	–
	> 59	2.5 (1.2–5.2, <i>p</i> = 0.013)	1.6 (0.5–4.9, <i>p</i> = 0.41)
BMI (kg/m ²)*	< 25	–	–
	> 25	3.4 (1.6–8.2, <i>p</i> = 0.004)	0.6 (0.1–2.2, <i>p</i> = 0.42)
D-dimer (ng/ml)*	< 1377	–	–
	> 1377	28.6 (8.5–179.1, <i>p</i> < 0.001)	3.6 (0.8–26.1, <i>p</i> = 0.13)
CRP (mg/l)*	< 110	–	–
	> 110	5.5 (2.1–17.2, <i>p</i> = 0.001)	1.5 (0.4–5.8, <i>p</i> = 0.53)

BMI body mass index, *CRP* C-reactive protein, *VWF:Ag* von Willebrand factor antigen

In the multivariate analysis the model was adjusted for age*, BMI (25 kg/m² as cut-off), D-dimer* and CRP*. *Variables were dichotomized according to the median

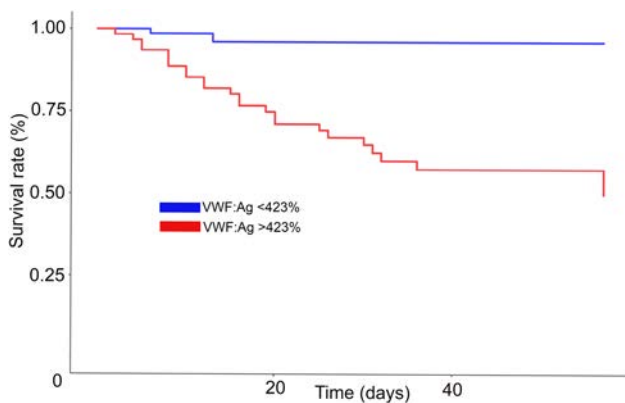


Fig. 4 Survival curves according to von Willebrand factor antigen concentration using a Kaplan–Meier estimator. Data are shown for patients with low von Willebrand factor antigen (<423%) and high von Willebrand factor antigen (>423%). Survival curves are compared using the log-rank test

hamper excessive VWF large multimers binding to platelets and the ensuing microthrombosis could be the use of novel TTP treatments caplacizumab [45] or anfibatide [46], both of which inhibit the binding of platelets to the VWF at the GPIX-Ib receptor.

Limitation of our study include the absence of iterative biomarker measurement over time to provide a more accurate picture of endothelial dysfunction during COVID-19 evolution.

In conclusion, our study provides new insights confirming that COVID-19 is a microvascular disease, in particular for critical forms of COVID-19. Inflammation and SARS-CoV-2 activates and/or directly injure ECs. In our cohort, circulating VWF levels were highly correlated with clinical severity and were the best endothelial marker to predict in-hospital mortality. Beyond its involvement as a biomarker, VWF and HMWM as thrombosis actors

	n	a HR	95%CI	p-value
VWF:Ag >423%	74	9.46	1.99-44.9	0.005
Age >59 years	111	1.30	0.55-3.10	0.549
BMI >25 kg/m ²	124	0.52	0.20-1.40	0.163
D-dimer >1377 ng/mL	117	3.56	0.80-16.0	0.097
CRP >110 mg/L	96	0.79	0.28-2.20	0.659

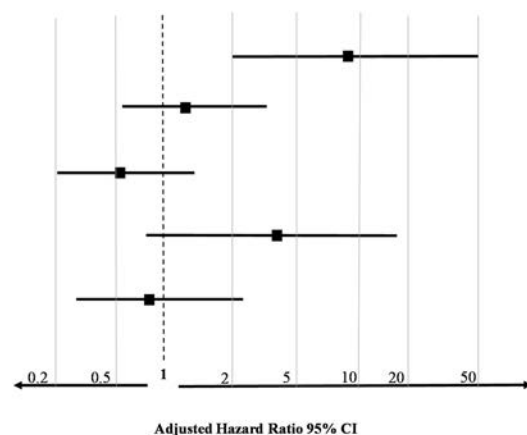


Fig. 5 Forest plot showing the Cox proportional hazards model for von Willebrand factor antigen adjusted for age, body mass index, D-dimer and C-reactive protein. Values are hazard ratios with 95%

confidence intervals. *VWF:Ag* von Willebrand factor antigen, *BMI* body mass index, *CRP* C-reactive protein, *aHR* adjusted hazard ratio, *CI* confidence interval

emphasize the link between microvascular thrombosis and endothelial injury during COVID-19. Measurement of VWF:Ag could therefore represent a quick, easy, and non-invasive way to point out the most severe form of COVID-19 but also assess treatments efficiency during follow-up.

Funding This work was funded with grants from French national agency for research ANR SARCODO (Fondation de France) and Mécénat Covid AP-HP.

Compliance with ethical standards

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


References

1. Debuc B, Smadja DM (2020) Is COVID-19 a new hematologic disease? *Stem Cell Rev Rep* 10:15. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09987-4>
2. Libby P, Lüscher T (2020) COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J* 41(32):3038–3044
3. Connors JM, Levy JH (2020) COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood* 135(23):2033–2040
4. Khider L, Gendron N, Goudot G et al (2020) Curative anticoagulation prevents endothelial lesion in COVID-19 patients. *J Thromb Haemost* 18:2391
5. Tang N, Bai H, Chen X et al (2020) Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J Thromb Haemost* 18:1520
6. Zhou F, Yu T, Du R et al (2020) Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet Lond Engl* 395(10229):1054–1062
7. Goudot G, Chocron R, Augy J-L et al (2020) Predictive factor for COVID-19 worsening: insights for high-sensitivity troponin and D-dimer and correlation with right ventricular afterload. *Front. Med.* 7:20. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.586307>
8. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P et al (2020) Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet Lond Engl* 395(10234):1417–1418
9. Ackermann M, Stark H, Neubert L et al (2020) Morphomolecular motifs of pulmonary neoangiogenesis in interstitial lung diseases. *Eur Respir J* 55(3):1900933
10. Guervilly C, Burtsey S, Sabatier F et al (2020) Circulating endothelial cells as a marker of endothelial injury in severe COVID-19. *J. Infect. Dis.* 222:1789
11. Magro C, Mulvey JJ, Berlin D et al (2020) Complement associated microvascular injury and thrombosis in the pathogenesis of severe COVID-19 infection: a report of five cases. *Transl Res* 220:1–13
12. Mehta P, McAuley DF, Brown M et al (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet Lond Engl* 395(10229):1033–1034
13. Smadja DM, Guerin CL, Chocron R et al (2020) Angiopoietin-2 as a marker of endothelial activation is a good predictor factor for intensive care unit admission of COVID-19 patients. *Angiogenesis.* 23:611
14. Péré H, Podglajen I, Baillard J-L et al (2020) Thermal inactivation and nucleic acid amplification-based testing for SARS-CoV-2. *J Clin Virol* 131:104588
15. Pikta M, Zemtsovskaja G, Bautista H et al (2018) Preclinical evaluation of a semi-automated and rapid commercial electrophoresis assay for von Willebrand factor multimers. *J. Clin. Lab. Anal.* 32(6):22416
16. Bowyer AE, Goodfellow KJ, Seidel H et al (2018) Evaluation of a semi-automated von Willebrand factor multimer assay, the Hydragel 5 von Willebrand multimer, by two European Centers. *Res Pract Thromb Haemost* 2(4):790–799
17. Veyradier A, Obert B, Houllier A, Meyer D, Girma JP (2001) Specific von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic microangiopathies: a study of 111 cases. *Blood* 98(6):1765–1772
18. Goshua G, Pine AB, Meizlish ML et al (2020) Endotheliopathy in COVID-19-associated coagulopathy: evidence from a single-centre, cross-sectional study. *Lancet Haematol* 7(8):e575–e582
19. Cugno M, Meroni PL, Gualtierotti R et al (2020) Complement activation and endothelial perturbation parallel COVID-19 severity and activity. *J Autoimmun* 116:102560
20. Lenting PJ, Casari C, Christophe OD, Denis CV (2012) von Willebrand factor: the old, the new and the unknown. *J Thromb Haemost JTH* 10(12):2428–2437
21. Chen J, Chung DW (2018) Inflammation, von Willebrand factor, and ADAMTS13. *Blood* 132(2):141–147
22. Ledford H (2020) Coronavirus breakthrough: dexamethasone is first drug shown to save lives. *Nature* 582(7813):469
23. Zakkar M, Luong LA, Chaudhury H et al (2011) Dexamethasone arterializes venous endothelial cells by inducing mitogen-activated protein kinase phosphatase-1: a novel antiinflammatory treatment for vein grafts? *Circulation* 123(5):524–532
24. Gelati M, Corsini E, De Rossi M et al (2002) Methylprednisolone acts on peripheral blood mononuclear cells and endothelium in inhibiting migration phenomena in patients with multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59(5):774–780
25. Dufour A, Corsini E, Gelati M et al (1998) Modulation of ICAM-1, VCAM-1 and HLA-DR by cytokines and steroids on HUVECs and human brain endothelial cells. *J Neurol Sci* 157(2):117–121
26. Blecharz KG, Drenckhahn D, Förster CY (2008) Glucocorticoids increase VE-cadherin expression and cause cytoskeletal rearrangements in murine brain endothelial cEND cells. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 28(6):1139–1149
27. Mojiri A, Alavi P, Lorenzana Carrillo MA et al (2019) Endothelial cells of different organs exhibit heterogeneity in von Willebrand factor expression in response to hypoxia. *Atherosclerosis* 282:1–10
28. Ruggeri ZM (2003) Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost JTH* 1(7):1335–1342
29. Dong J, Moake JL, Nolasco L et al (2002) ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* 100(12):4033–4039
30. Escher R, Breakey N, Lämmle B (2020) ADAMTS13 activity, von Willebrand factor, factor VIII and D-dimers in COVID-19 inpatients. *Thromb Res* 192:174–175
31. Rovas A, Osiaevi I, Buscher K et al (2020) Microvascular dysfunction in COVID-19: the MYSTIC study. *Angiogenesis* 14:1–13
32. Diehl J-L, Peron N, Chocron R et al (2020) Respiratory mechanics and gas exchanges in the early course of COVID-19 ARDS: a hypothesis-generating study. *Ann Intensive Care* 10(1):95
33. Diehl J-L, Peron N, Philippe A, Smadja DM (2020) Response to Damiani and colleagues. *Ann Intensive Care* 10:147
34. Hubbard AR, Hamill M, Eikenboom HCJ et al (2012) Standardization of von Willebrand factor propeptide: value assignment

- to the WHO 6th IS factor VIII/von Willebrand factor, plasma (07/316). *J Thromb Haemost* 10(5):959–960
35. Hottz ED, Azevedo-Quintanilha IG, Palhinha L et al (2020) Platelet activation and platelet-monocyte aggregate formation trigger tissue factor expression in patients with severe COVID-19. *Blood* 136(11):1330–1341
 36. Manne BK, Denorme F, Middleton EA et al (2020) Platelet gene expression and function in patients with COVID-19. *Blood* 136(11):1317–1329
 37. Lösche W, Boettel J, Kabisch B et al (2012) Do aspirin and other antiplatelet drugs reduce the mortality in critically ill patients? *Thrombosis* 2012:720254
 38. Valerio-Rojas JC, Jaffer IJ, Kor DJ, Gajic O, Cartin-Ceba R (2013) Outcomes of severe sepsis and septic shock patients on chronic antiplatelet treatment: a historical cohort study. *Crit Care Res Pract* 2013:782573
 39. Chen W, Janz DR, Bastarache JA et al (2015) Prehospital aspirin use is associated with reduced risk of acute respiratory distress syndrome in critically ill patients: a propensity-adjusted analysis. *Crit Care Med* 43(4):801–807
 40. Harr JN, Moore EE, Johnson J et al (2013) Anti-platelet therapy is associated with decreased transfusion-associated risk of lung dysfunction, multiple organ failure, and mortality in trauma patients. *Crit Care Med* 41(2):399–404
 41. Tsai M-J, Ou S-M, Shih C-J et al (2015) Association of prior antiplatelet agents with mortality in sepsis patients: a nationwide population-based cohort study. *Intensive Care Med* 41(5):806–813
 42. Boyle AJ, Di Gangi S, Hamid UI et al (2015) Aspirin therapy in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS) is associated with reduced intensive care unit mortality: a prospective analysis. *Crit Care Lond Engl* 19:109
 43. Eisen DP, Leder K, Woods RL et al (2020) Effect of aspirin on deaths associated with sepsis in healthy older people (ANTISEPSIS): a randomised, double-blind, placebo-controlled primary prevention trial. *Lancet Respir Med* 10:20. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30411-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30411-2)
 44. Chow JH, Khanna AK, Kethireddy S et al (2020) Aspirin use is associated with decreased mechanical ventilation, ICU admission, and in-hospital mortality in hospitalized patients with COVID-19. *Anesth Analg*. Volume Publish Ahead of Print
 45. Dutt T, Shaw RJ, Stubbs MJ et al Real-world evidence of caplacizumab use in the management of acute TTP. *Blood*
 46. Zheng L, Mao Y, Abdelgawwad MS et al (2016) Therapeutic efficacy of the platelet glycoprotein Ib antagonist anfibatide in murine models of thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood Adv* 1:75–83

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Aurélien Philippe¹ · Richard Chocron² · Nicolas Gendron¹ · Olivier Bory³ · Agathe Beauvais³ · Nicolas Peron⁴ · Lina Khider⁵ · Coralie L. Guerin⁶ · Guillaume Goudot⁵ · Françoise Levasseur¹⁵ · Christophe Peronino¹ · Jerome Duchemin¹³ · Julie Brichet¹ · Elise Sourdeau¹⁴ · Florence Desvard¹ · Sébastien Bertil¹ · Frédéric Pene¹⁶ · Cherifa Cheurfa¹⁷ · Tali-Anne Szebel¹⁸ · Benjamin Planquette⁷ · Nadia Rivet¹ · Georges Jourdi⁸ · Caroline Hauw-Berlemont⁴ · Bertrand Hermann⁴ · Pascale Gaussem¹ · Tristan Mirault⁹ · Benjamin Terrier¹⁰ · Olivier Sanchez⁷ · Jean-Luc Diehl¹¹ · Michaela Fontenay¹² · David M. Smadja¹ 

¹ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Hematology Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), Assistance Publique Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (APHP-CUP), 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France

² Université de Paris, PARCC, INSERM, Emergency Department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

³ Université de Paris, Emergency department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

⁴ Université de Paris, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

⁵ Université de Paris, Vascular Medicine Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), Assistance Publique Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

⁶ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Curie Institute, Cytometry department, 75006 Paris, France

⁷ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Respiratory Medicine

Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

⁸ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Hematology Department Assistance Publique Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (APHP-CUP), 75014 Paris, France

⁹ Université de Paris, PARCC, INSERM, 75015 Paris, France, Vascular medicine department, Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

¹⁰ Université de Paris, PARCC, INSERM U970, 75015 Paris, France, Internal Medicine Department, APHP-Centre Université de Paris (CUP), 75014 Paris, France

¹¹ Université de Paris, Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, 75006 Paris, France, Intensive Care Unit and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), Assistance Publique - Hôpitaux de Paris-Centre (APHP-CUP), 75015 Paris, France

¹² Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, 75014 Paris, France, Hematology Department Assistance Publique Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (APHP-CUP), Cochin Hospital, 75014 Paris, France

-
- ¹³ Hematology Department, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (AP-HP.CUP), Cochin Hospital, 75014 Paris, France
- ¹⁴ Emergency department, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (AP-HP.CUP), Hôtel-Dieu Hospital, 75014 Paris, France
- ¹⁵ Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, 75014 Paris, France
- ¹⁶ Intensive Care Medicine and Reanimation Department, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris. Centre-Université de Paris (AP-HP.CUP), Cochin Hospital, 75014 Paris, France
- ¹⁷ Anaesthesia, Intensive Care and Perioperative Medicine Department, GHU AP-HP, Centre - Université de Paris - Cochin Hospital, 75014 Paris, France
- ¹⁸ Internal Medicine Department, AP-HP. Centre - Université de Paris - Cochin Hospital, 75014 Paris, France

Autoregulation of Pulsatile Bioprosthetic Total Artificial Heart is Involved in Endothelial Homeostasis Preservation

David M. Smadja¹ Richard Chocron² Elisa Rossi³ Bastien Poitier⁴ Yuri Pya⁵
 Mahabbat Bekbossynova⁵ Christophe Peronino¹ Jeanne Rancic¹ Jean Christian Roussel⁶
 Michel Kindo⁷ Nicolas Gendron¹ Ludovica Migliozi⁴ Antoine Capel⁸ Jean Christophe Perles⁸
 Pascale Gaussem⁹ Peter Ivak¹⁰ Piet Jansen⁸ Claude Girard¹¹ Alain Carpentier³
 Christian Latremouille⁴ Coralie Guerin¹² Ivan Netuka¹⁰

¹Inserm UMR-S 1140, Innovative Therapies in Haemostasis, Service d'Hématologie et Laboratoire de Recherches Biochirurgicales (Fondation Carpentier), Université de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

²Inserm UMR-S 970 PARCC, Service d'urgences, Université de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

³Innovative Therapies in Haemostasis, Université de Paris, Paris, France

⁴Innovative Therapies in Haemostasis, Service de Chirurgie Cardiaque et Laboratoire de Recherches Biochirurgicales (Fondation Carpentier), Université de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

⁵National Research Cardiac Surgery Center, Astana, Kazakhstan

⁶Service de Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire, Unité de transplantation thoracique, CHU de Nantes, Hôpital Nord Laënnec, Saint-Herblain, Nantes Cedex 1, France

⁷Service de Chirurgie Cardiovasculaire, NHC- Hôpital Civil, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 1, Place de L'Hôpital, Strasbourg, Cedex, France

Address for correspondence David M. Smadja, MD, PhD, Hematology Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), Georges Pompidou European Hospital, 20 Rue Leblanc, 75015 Paris, France (e-mail: david.smadja@aphp.fr).

⁸Carmat SAS, Velisy-Villacoublay, France

⁹Innovative Therapies in Haemostasis, Service d'Hématologie, Université de Paris, Georges Pompidou European Hospital, Paris, France

¹⁰Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

¹¹Unité d'Anesthésie Réanimation Cardio-Vasculaire, CHU François Mitterrand, Dijon Cedex, France

¹²Innovative Therapies in Haemostasis, Plateforme de Cytométrie, Institut Curie, Université de Paris, Paris, France

Thromb Haemost

Abstract

Pulsatile Carmat bioprosthetic total artificial heart (C-TAH) is designed to be implanted in patients with biventricular end-stage heart failure. Since flow variation might contribute to endothelial dysfunction, we explored circulating endothelial biomarkers after C-TAH implantation in seven patients and compared the manual and autoregulated mode. Markers of endothelial dysfunction and regeneration were compared before and during a 6- to 9-month follow-up after implantation. The follow-up was divided into three periods (< 3, 3–6, and > 6 months) and used to estimate the temporal trends during the study period. A linear mixed model was used to analyze repeated measures and association between tested parameters according to the mode of C-TAH and the time. Relevance of soluble endoglin (sEndoglin) level increase has been tested on differentiation and migration potential of human vasculogenic progenitor cells (endothelial colony forming cells [ECFCs]). Normal sEndoglin and soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels were found in patients after implantation with autoregulated C-TAH, whereas they significantly increased in the manual mode, as compared with pretransplant values ($p = 0.005$ and 0.001 , respectively). In the autoregulated mode, a significant increase in the mobilization of cytokine

Keywords

- ▶ bioprosthetic total artificial heart
- ▶ biomarker
- ▶ endothelial
- ▶ sEPCR
- ▶ sEndoglin
- ▶ endothelial progenitors
- ▶ ECFC

received
 January 2, 2020
 accepted after revision
 May 18, 2020

© Georg Thieme Verlag KG
 Stuttgart · New York

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0040-1713751>.
 ISSN 0340-6245.

stromal cell-derived factor 1 was found ($p = 0.03$). After adjustment on the mode of C-TAH, creatinine or C-reactive protein level, sEndoglin, and sEPCR, were found significantly associated with plasma total protein levels. Moreover, a significant decrease in pseudotubes formation and migration ability was observed in vitro in ECFCs receiving sEndoglin activation. Our combined analysis of endothelial biomarkers confirms the favorable impact of blood flow variation achieved with autoregulation in patients implanted with the bioprosthetic total artificial heart.

Introduction

Heart transplantation offers the most effective therapy for patients with end-stage heart failure, yet is severely limited by organ shortage and, in some cases, precluded by comorbidities. The Carmat total artificial heart (C-TAH) is an implantable electrohydraulically actuated biventricular pump that has been developed to minimize these drawbacks and mimics the natural heart in size and function. We previously demonstrated the biocompatibility of this device in vitro, in calves, and in a pilot study evaluating safety and performance in four patients.^{1–4} In this first trial, some cutaneous bleeding episodes occurred in patients 2 and 3 independently from any acquired von Willebrand syndrome (AVWS)¹ or anticoagulation. Moreover, worsening of renal function after implantation occurred in both patients associated with lower limb edema during a long-term follow-up. In this feasibility study, the pump was managed in the manual mode with a constant cardiac output. In the current European pivotal study, the C-TAH has now an autoregulation (autoregulated mode) where the output is modulated by venous return, mimicking normal cardiac function.⁵ The device has been successfully switched to autoregulated mode in the operating room in all patients, providing a cardiac output adapted to venous return similar to the Starling law.⁵ Thus, the C-TAH in autoregulated mode seems to come close to a physiological interaction between heart bioprosthesis and patient. Renal impairment and lower limb edema³ observed in patients with manual mode could be at the origin of endothelial dysfunction. Moreover, since pressure regulation associated to peripheral circadian clock have been described to impact vascular endothelial dysfunction in disease and aging,⁶ we can speculate that automatic regulation of vascular tone would improve vascular homeostasis.

Regeneration of endothelium after C-TAH implantation could also be an important process. Indeed, we previously described a newly formed endothelial layer on the C-TAH hybrid membrane that is unlikely to result from patient's endothelial cell migration because there is no physical connection to patient blood vessels.¹ Vasculogenic cell deposition on fibrin adsorbed on xenopericardial tissue could result from mobilized circulating stem or progenitor cells. Therefore, cytokines, supposed to induce this mobilization, could be involved in the hemocompatibility process.⁷ Since hemodynamic factors have been described to influence all steps of endothelial formation and remodeling process,⁸ the autoregulated mode could also interfere with this neo-angiogenic process.

The aim of the present study was to analyze circulating endothelial biomarkers involved in endothelium activation,

damage, or regeneration after C-TAH implantation. Since variations in flow can contribute to endothelial dysfunction, our first objective was to compare the selected biomarkers between C-TAH autoregulated mode and the manual mode.

Methods

Patients and Laboratory Assessment

The C-TAH is a biventricular pulsatile, electrically powered, hydraulically actuated flow pump with all components embodied in a single device, mimicking the natural heart, and implanted in the pericardial sac as previously described.³ Seven patients (all men) were included in this study with a follow-up of more than 6 months after C-TAH implantation: two patients were from the feasibility study with the device functioning in manual mode and five patients from the pivotal study with the device in autoregulation (► **Supplementary Table S1**, available in the online version). All medication for the seven patients are reported in ► **Supplementary Table S2** (available in the online version). All patients had severe end-stage biventricular heart failure, secondary to ischemic or nonischemic cardiomyopathy. The feasibility study was registered in the European Databank on Medical Devices (CIV-FR-13-09-011615). The pivotal study was registered in clinicalTrials.gov (Identifier: NCT02962973). All patients had signed the informed consent, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Clinical characteristics of patients are described in ► **Supplementary Table S1** (available in the online version). In our study, patients have been followed with a median of 8 months (range 6–9). Weekly sampling is done only during the first month after implantation and we choose to avoid any postimplantation direct effect to explore this period and started at month 1. After 4 first weeks, patients had only a monthly evaluation. Each month values were pooled in each period, each patient has a monthly sample, with at least three different samples per period and per patients. All samples were collected on 0.129 M trisodium citrate tubes (9NC BD Vacutainer, Plymouth, United Kingdom). Laboratory assessments were done on platelet-poor plasma (PPP) isolated from citrate tubes. PPP was obtained after centrifugation twice at $2,500 \times g$ for 15 minutes. PPP was frozen and stored at -80°C until analysis. Soluble E-selectin (sE-selectin), soluble endoglin (sEndoglin), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), angiopoietin-1 and -2, c-Kit, and stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) were determined with a Human Magnetic Luminex Assay from R&D Systems (Lille, France). Data were collected with the Bio-Plex Manager 5.0 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette,

France). Soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) and soluble thrombomodulin were measured with enzyme-linked immunosorbent assay kits, as recommended by the manufacturer (Asserachrom sEPCR, Stago, Asnières, France, and R&D Systems, thrombomodulin reference: DTHBDO).

Endothelial Colony Forming Cells Isolation and Culture

Umbilical cord blood samples were collected from consenting mothers in agreement with the Declaration of Helsinki. The study was approved by the ethics committee of the Hôpital des Instructions et des Armées de Bégin (Saint-Mandé, France) (ref. 201,008,043,234,797). Endothelial colony forming cells (ECFCs) were isolated from the mononuclear cell fraction as described elsewhere.^{9–11} ECFCs were then expanded on fibronectin-coated plates (1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$; Millipore, Billerica, Massachusetts, United States) using EGM-2 SingleQuots (Lonza, Walkersville, Maryland, United States) and 10% fetal calf serum (FCS) (without hydrocortisone; Lonza).

In Vitro Matrigel Tube Formation Assay

After 16 hours of serum and growth factor privation, ECFCs obtained from human cord blood according to international recommendations¹² (50,000 cells/well in 500 μL EGM-2) were seeded onto growth factor-reduced Matrigel (150 $\mu\text{L}/\text{well}$ in 48-well plate) \pm sEndoglin at the concentration of 40 and 100 ng/mL (Corning, New York, United States) in EGM-2 medium and cultured for 24 hours at 37°C in 95% air/5% CO₂ atmosphere. Capillary-like structures were observed by phase-contrast microscopy and networks formed by ECFCs were quantified using Videomet software version 5.4.0. (Microvision Instruments, Corbeil Essonne, France).

Boyden Chamber Migration Assay

ECFC migration was measured in 24-well modified Boyden chambers (Costar, Avon, France) equipped with 8- μm pore-size filters. ECFCs were seeded at a density of 20,000 cells per well in 100 μL of EBM2/1% FCS \pm sEndoglin at the concentration of 40 and 100 ng/mL, and were allowed to migrate for 5 hours at 37°C. A total of 600 μL of EBM2 containing 50 ng/mL VEGF-A were added in the lower chamber.

Wound Healing Assay

After 16 hours of serum and growth factor privation, a reproducible circular “wound” was made with a tip in confluent monolayers of ECFCs cultured in 12-well plates and sEndoglin at the concentration of 0 (control), 40, and 100 ng/mL was added. The wound area was measured at $\times 20$ magnification under an inverted microscope, then the medium was removed and the cells were further incubated for 24 hours. Wound repair activity was calculated by expressing the area of the wound after 24 hours of incubation as a percentage of the initial area.

Statistical Analysis

Univariate Analysis

Continuous data were expressed as mean \pm standard deviation for normally distributed data and as median interquar-

tile range (25–75%) for nonnormally distributed data. Categorical data were presented as number (*n*) and percent. Comparisons used the chi-square test for categorical variables and Student's *t*-test or Mann–Whitney–Wilcoxon test, when appropriate, for continuous variables. The follow-up duration, divided into three periods (less than 3 months, between 3 and 6 months, and over 6 months), was used to estimate the temporal trends during the study period, and differences were tested by the Kruskal–Wallis test. We evaluated the correlation between endothelial/angiogenic markers using Kendall correlation test.

Multivariate Analysis

We analyzed repeated measures data¹³ and tested the association between creatinine level or protein level with each endothelial/angiogenic markers (sE-Selectin, sEndoglin, sEPCR, angiopoietin-1, angiopoietin-2, VEGF-A, VEGFR2, SDF1- α , basic fibroblast growth factor, c-Kit, and soluble thrombomodulin). For each endothelial/angiogenic, we set up a separated linear mixed model taking into account the mode of C-TAH (manual or autoregulated) and repeated measures over time.¹⁴ To assess and evaluate protein involvement, we adjusted each linear mixed model between creatinine level and each endothelial/angiogenic biomarker on protein level, and inversely, linear mixed model between protein level and each endothelial/angiogenic biomarker adjusted on creatinine level. All analyses were two-sided and a *p*-value was considered as statistically significant for *p* < 0.05. Statistical analysis was performed using R studio software (RStudio Inc, Boston, Massachusetts, United States).

In Vitro Data Analysis

In complementary analysis, to assess the influence of sEndoglin concentration on tube migration, wound healing process, and migration in Boyden chamber, we compared the mean of migrated cell in each group (40, 100 ng/mL) to control group (without sEndoglin) using nonparametric Mann–Whitney *U* test.

Results

Patient Description

Patients in manual mode (feasibility study) were 68- and 74-year-old males with end-stage biventricular failure and not eligible for cardiac transplantation as previously described.³ Both patients were discharged immediately after surgery to an intensive care unit (ICU). They had intermittent hemofiltration in the early postoperative phase, to support renal recovery. Moreover, both patients had decreased renal function during follow-up of respectively 9 and 8 months. Both also had some episodes of peripheral edema, managed with diuretics. Surprisingly, follow-up of patients in the manual mode demonstrated hemoconcentration, as evaluated with total protein levels (data not shown). As previously described, the 74-year-old man also presented with cutaneous bleeding.^{3,15} Patients in autoregulated mode (pivotal study) were 60-, 68-, 66-, 35-, and 43-year-old males with end-stage biventricular failure; three were eligible for transplantation and two were not. All

patients were discharged immediately after surgery to an ICU. ICU course was uneventful. None of the patients had renal failure after surgery or during the follow-up. No clinically significant episodes of peripheral edema were observed in these patients. Total protein levels, evaluated during follow-up, did not show any significant modification according to the periods studied (data not shown). To better appreciate renal function during the follow-up in our two groups of patients, we performed a linear regression with time as an outcome (► **Supplementary Table S3**, available in the online version). This analysis allowed us to confirm that creatinine was significantly increased along time only in patients receiving manual mode ($p = 0.04$) in contrast to autoregulated mode ($p = 0.51$).

sEPCR and sEndoglin are Increased during Follow-Up in Patient Receiving C-TAH in Manual Mode

The kinetics of endothelial and angiogenic cytokine levels were analyzed during the first year post-C-TAH implantation. Three groups were determined according to follow-up duration: less than 3 months (hospitalization), between 3 and 6 months, and above 6 months. At baseline, before C-TAH implantation, plasma parameters exploring mobilization did not differ between patients receiving manual and autoregulated mode (► **Supplementary Table S4**, available in the online version). In markers of lesion or dysfunction, a trend is observed for sE-selectin and sEndoglin, and a significant increase is observed in patients' receiving C-TAH in manual mode for soluble thrombomodulin. After C-TAH manual mode implantation, sEndoglin and sEPCR significantly increased along time (p -value at 0.005 and 0.001, respectively), while other biomarkers were not modified (► **Table 1**). We observed an increase in the level of sE-selectin during follow-up of patient with C-TAH in manual mode but nonsignificant (p -value = 0.28) probably due to very high levels before implantation. After autoregulated C-TAH implantation, in contrast to manual mode, sEndoglin and sEPCR were not modified after C-TAH implantation (► **Table 2**). To confirm these results, we performed a linear regression with

time as an outcome (► **Supplementary Table S3**, available in the online version) for sE-selectin, sEndoglin, and sEPCR. This analysis allowed us to confirm that only sEndoglin and sEPCR was significantly increased along time only in patients receiving manual mode (p -value = 0.01 and 0.007, respectively, for sEndoglin and sEPCR) in contrast to autoregulated mode (p -value = 0.7 and 0.56, respectively, for sEndoglin and sEPCR). We explored association between sEPCR and sEndoglin in manual and autoregulated populations, and found a significant and stronger association only in patients receiving C-TAH in manual mode (p -value = 0.0006 with coefficient of correlation to 0.57 in manual mode in contrast with a p -value = 0.28 with a coefficient of correlation to 0.12 for autoregulated mode). Moreover, soluble thrombomodulin is not associated to sEPCR levels (p -value = 0.14 with coefficient of correlation to 0.24 in manual mode and $p = 0.08$ with a coefficient of correlation to 0.19 for autoregulated mode). Finally, after autoregulated C-TAH implantation, we observed a significant increase of SDF-1 after C-TAH implantation ($p = 0.03$, ► **Table 1**).

Circulating Protein Level Modification is Linked to sEndoglin and sEPCR

As shown in ► **Table 3**, after adjustment on the mode of C-TAH (manual or autoregulated mode), the levels of the three endothelial biomarkers of endothelial dysfunction, sE-selectin, sEndoglin, and sEPCR, were all significantly and positively associated with plasma total protein level (p -value < 0.05 for each). After adjustment on the mode of the C-TAH and creatinine or C-reactive protein (CRP) level, endothelial biomarkers of endothelial dysfunction sEndoglin and sEPCR were still significantly associated with protein levels (p -value = 0.01 for both sEndoglin and sEPCR after adjustment to creatinine; p -value = 0.04 and 0.01, respectively, for sEndoglin and sEPCR after adjustment to CRP). After adjustment on the mode of C-TAH, creatinine was found associated only to soluble thrombomodulin levels (p -value < 0.001, ► **Supplementary Table S5**, available in the online version).

Table 1 Temporal trend of endothelial/angiogenic biomarkers in patients receiving manual mode C-TAH

	C-TAH in manual mode ng/mL [mean (SD)]				<i>p</i> -Value
	Before C-TAH	< Month 3	Month 3–6	> Month 6	
sE-selectin	7638.75 (433.10)	4906.50 (1302.35)	5812.58 (1888.52)	5625.50 (1870.05)	0.28
sEndoglin	52.50 (2.12)	59.33 (7.66)	77.33 (10.69)	68.80 (7.46)	0.005
sEPCR	111.85 (26.66)	176.57 (39.83)	250.60 (28.55)	214.57 (40.85)	0.001
Angiopoietin-1	74.75 (35.00)	56.33 (28.08)	58.67 (14.92)	58.40 (28.53)	0.84
Angiopoietin-2	367.00 (128.69)	1143.33 (732.69)	1018.42 (611.26)	937.00 (556.91)	0.51
VEGF-A	45.00 (8.49)	49.58 (5.41)	42.75 (4.14)	44.40 (1.82)	0.11
VEGFR2	795.75 (126.93)	800.00 (131.57)	778.17 (81.98)	790.60 (121.72)	0.99
SDF1- α	142.00 (94.75)	241.75 (177.75)	260.67 (189.91)	261.60 (246.23)	0.89
c-Kit	353.25 (41.37)	239.50 (87.69)	486.42 (368.06)	674.00 (358.15)	0.13
Soluble thrombomodulin	7373.35 (2672.51)	7791.21 (3591.99)	7847.99 (2247.98)	6275.32 (2794.29)	0.80

Abbreviations: C-TAH, Carmat bioprosthetic total artificial heart; SD, standard deviation; SDF1- α , stromal cell-derived factor 1- α ; sEndoglin, soluble endoglin; sEPCR, soluble endothelial protein C receptor; sE-selectin, soluble E-selectin; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

Table 2 Temporal trend of endothelial/angiogenic biomarkers in patients receiving autoregulated mode C-TAH

	C-TAH in autoregulated mode ng/mL [mean (\pm SD)]				
	Before C-TAH	< Month 3	Month 3–6	> Month 6	p-Value
sE-selectin	5905.40 (1004.57)	4789.82 (1668.56)	4897.65 (1269.03)	4799.70 (1502.64)	0.49
sEndoglin	82.10 (15.78)	60.11 (17.53)	72.04 (11.12)	67.00 (21.07)	0.06
sEPCR	160.91 (84.60)	180.71 (74.08)	214.68 (146.61)	174.12 (116.95)	0.75
Angiopoietin-1	345.10 (372.85)	142.96 (75.77)	209.85 (263.12)	85.00 (62.45)	0.21
Angiopoietin-2	958.90 (468.57)	1180.21 (490.60)	1160.50 (520.93)	661.40 (332.16)	0.19
VEGF-A	40.00 (3.74)	43.07 (9.04)	45.77 (12.90)	40.20 (8.14)	0.62
Soluble VEGFR-2	760.00 (243.52)	563.36 (220.72)	574.69 (119.27)	494.10 (205.87)	0.16
SDF1- α	154.00 (59.46)	125.61 (43.01)	183.35 (49.20)	164.30 (55.26)	0.03
c-Kit	673.00 (404.54)	369.29 (225.81)	454.81 (255.53)	299.90 (208.54)	0.11
Soluble thrombomodulin	3078.35 (497.64)	4587.73 (2073.32)	4285.63 (1610.25)	5654.62 (2087.06)	0.16

Abbreviations: C-TAH, Carmat bioprosthetic total artificial heart; SD, standard deviation; SDF1- α , stromal cell-derived factor 1- α ; sEndoglin, soluble endoglin; sEPCR, soluble endothelial protein C receptor; sE-selectin, soluble E-selectin; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

Table 3 Linear regression for the relationship between endothelial/angiogenic biomarkers levels and protein level

	Model 1				Model 2				Model 3			
	Linear regression model with protein				Linear regression model with protein adjusted on creatinine				Linear regression model with protein adjusted on CRP			
	Regression β coefficients	CI 95%		p-Value	Regression β coefficients	CI 95%		p-Value	Regression β coefficients	CI 95%		p-Value
sE-selectin	0.02	0.01	0.03	0.04	0.02	-0.04	0.07	0.11	0.02	-0.0002	0.002	0.09
sEndoglin	0.25	0.09	0.41	0.04	0.18	0.07	0.34	0.01	0.14	0.002	0.28	0.04
sEPCR	0.05	0.01	0.09	0.005	0.05	0.01	0.10	0.01	0.05	0.015	0.08	0.01
Angiopoietin-1	0.01	-0.04	0.04	0.97	0.01	-0.12	0.20	0.71	0.0005	-0.0007	0.001	0.38
Angiopoietin-2	-0.01	-0.06	0.03	0.14	-0.01	-0.08	0.09	0.53	-0.007	-0.039	0.025	0.64
VEGF-A	-0.05	-0.39	0.34	0.91	0.02	-0.11	0.14	0.88	-0.003	-0.009	0.001	0.17
Soluble VEGFR-2	0.01	-0.12	0.14	0.45	0.02	-0.08	0.08	0.57	0.03	-0.32	0.38	0.85
SDF1- α	0.02	-0.04	0.08	0.12	0.02	-0.03	0.09	0.09	-0.004	-0.021	0.013	0.64
c-Kit	0.01	-0.15	0.18	0.73	0.01	-0.12	0.17	0.69	0.009	-0.018	0.037	0.48
Soluble thrombomodulin	0.01	-0.01	0.02	0.1	0.01	-0.01	0.03	0.14	-0.004	-0.018	0.009	0.48

Abbreviations: CI, confidence interval; CRP, C-reactive protein; C-TAH, Carmat bioprosthetic total artificial heart; SD, standard deviation; SDF1- α , stromal cell-derived factor 1- α ; sEndoglin, soluble endoglin; sEPCR, soluble endothelial protein C receptor; sE-selectin, soluble E-selectin; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

Note: We set up three linear regression mixed models: Model 1: without adjustment; Model 2: adjusted on the mode of C-TAH and plasma creatinine level; Model 3: adjusted on the mode of C-TAH and plasma C-reactive protein (CRP).

After adding protein level adjustment, none of the endothelial biomarkers of endothelial dysfunction were associated with creatinine in our population.

sEndoglin Induces a Decrease in ECFC Angiogenic Ability

Since we observed a significant association between sEndoglin and protein level after C-TAH, we hypothesized that, more than being a marker of endothelial dysfunction, sEndoglin could also accelerate microvascular disorders already observed in heart failure patients. To test this hypothesis, we tested effect of sEndoglin (40 and 100 ng/mL) on angiogenic properties of ECFCs, well-recognized precursors of endothelial lineage. To assess whether sEndoglin affects ability of ECFCs to differentiate into cord-like structures in vitro, Matrigel assays were per-

formed. sEndoglin decreased pseudotubes network formation, as observed in **Fig. 1A**; however, without reaching statistical significance. sEndoglin also significantly decreased ECFC migration toward control medium in a modified Boyden chamber assay (p -value = 0.005 for sEndoglin at 40 ng/mL, **Fig. 1B**). This decrease of migration ability was further confirmed (**Fig. 1C**) in a wound healing model. ECFCs in presence of sEndoglin presented a decreased potential to recolonize the plastic culture surface, compared with nontreated ECFC. This difference was significant 9 hours after practicing the wound.

Taken together, our results indicate that sEndoglin repressed ECFC differentiation and migration capacities in vitro and suggest that upregulation of sEndoglin, observed after C-TAH implantation, could contribute to microvascular dysfunction.

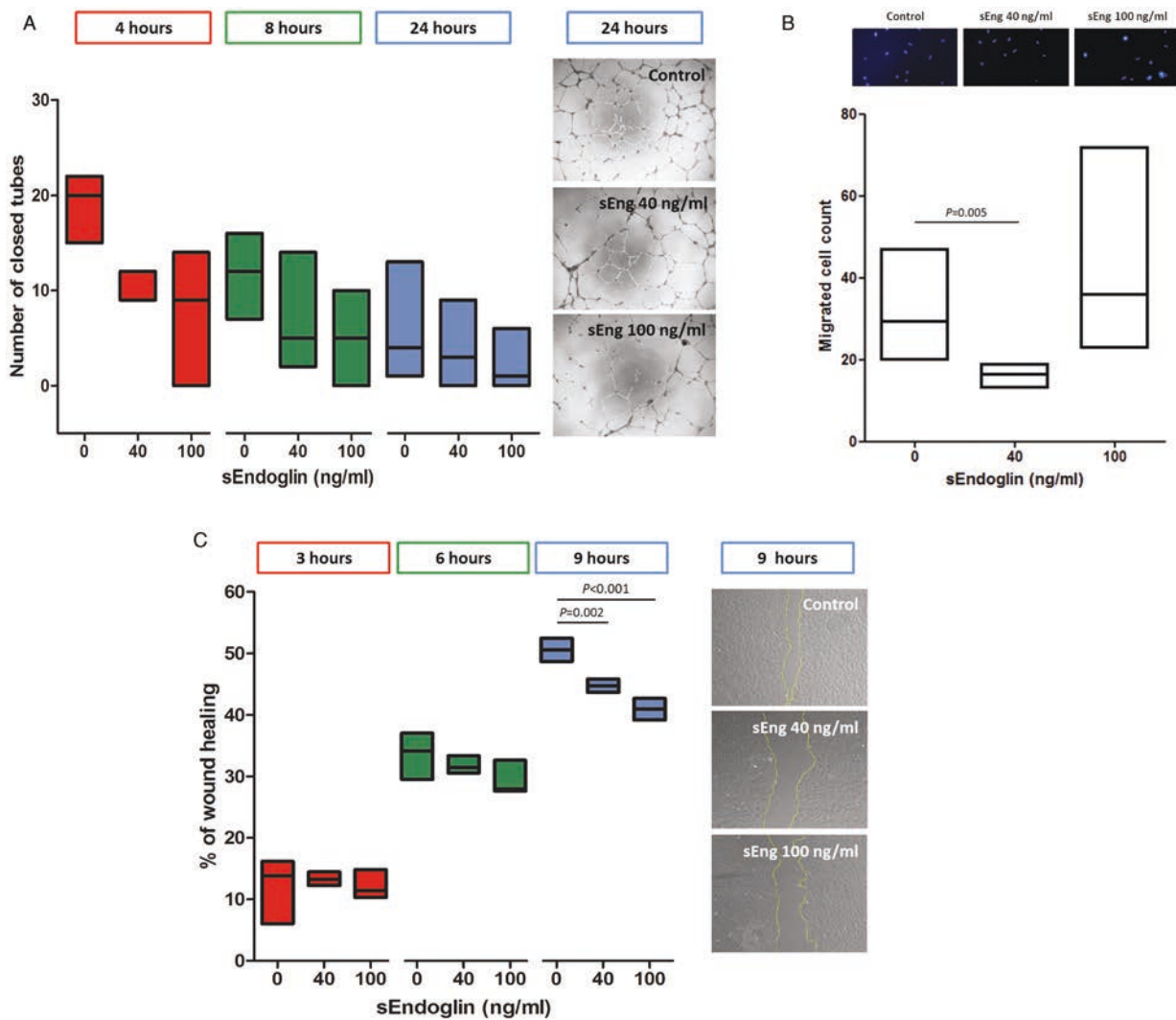


Fig. 1 Soluble endoglin (sEndoglin) decreases endothelial colony forming cell (ECFC) angiogenic function. (A) In vitro Matrigel tube formation assay with sEndoglin-treated ECFCs. Tube length quantification with Videomet exhibited a decreased ability to form enclosed area with sEndoglin-treated ECFCs, compared with control. Differentiation assay quantification: 3.10^4 ECFC in 500 μ L EBM2, fetal calf serum (FCS) 5% were seeded on a 48-well plate, containing 200 μ L of Matrigel per well. After 4, 8, and 24 hours at 37°C/5% CO₂, the length of the tube-like structures were measured using the Videomet software. sEndoglin-treated ECFC formed less enclosed area when compared with the control; however, the difference did not reach statistical significance. (B) sEndoglin effect on ECFCs was assessed for migration using a modified Boyden chamber assay. sEndoglin significantly decreased ECFC migratory ability compared with control ($p = 0.005$ for 40 ng/mL of sEndoglin). (C) Wound healing assay. Confluent monolayers of cord blood ECFCs were cultured and photomicrographs were taken at T0, T3, T6, and T9 hour, after inflicting a circular wound in the presence or in the absence of endoglin. Wound surface reduction at T9 hour was less pronounced in endoglin-treated ECFCs than in controls ($p = 0.002$ and < 0.001 , respectively, for 40 and 100 ng/mL of sEndoglin). Wound areas were measured with Videomet software, and compared with the initial area (T0) which represents the “0%” of cell migration.

Discussion

In this prospective study, we have demonstrated that implantation of the C-TAH led to differential profiles of endothelial biomarkers during follow-up, according to manual or autoregulated cardiac output regulation. These distinct expressions of endothelial biomarkers point to endothelial activation and/or vascular lesion. As compared with cardiac failure status prior to transplantation, endothelial alterations substantially worsened after C-TAH implantation when manual mode was used, as revealed by the higher levels of sEPCR and sEndoglin. Furthermore, the two C-TAH modes were not comparable in

terms of endothelial regeneration and/or stem cell mobilization capacities since SDF-1 increase was more pronounced in patients treated with autoregulated mode compared with manual mode.

The C-TAH was designed to mimic the natural heart in size and function. It uses electrohydraulic actuation of ventricular membranes to produce a physiologic flow profile. The feasibility study enrolled four patients³ with a C-TAH in manual mode, that is, with a constant cardiac output. In auto-mode functioning, the device aims to achieve patient-specific right and left inlet pressures, adjusts stroke volume and beat rate accordingly, resulting in a variable cardiac output, adapted according to

venous return. In this way, the C-TAH responds in a physiologic manner to alterations in preload, to maintain normal pressure in both atria and protecting the patient against venous congestion in particular in lung, liver, and kidney. Most mechanical circulatory devices currently used are left ventricular assist devices (LVADs). These continuous flow devices are associated with angiogenic disorders that give rise to angiodysplasia and gastrointestinal bleeding.¹⁶ Angiodysplasia have been linked to AVWS and an increase in angiopoietin-2.^{17,18} We previously demonstrated that change of pulsatility allows releasing factors stored in the Weibel–Palade bodies—that is, von Willebrand factor or angiopoietin-2.¹⁹ Moreover, we have already demonstrated the absence of AVWS in both calves and patients implanted with the C-TAH.^{1,2} In this study, we have shown absence of angiopoietin-2 modulation, independently of auto- or manual mode regulation. Other biomarkers like tumor necrosis factor- α ²⁰ or transforming growth factor β (TGF- β)²¹ have been proposed to modulate angiogenesis or related thrombotic disorders in LVAD long-term implantation and need to be explored after C-TAH implantation. Thus, hemocompatibility of the C-TAH, in terms of angiogenic disorders and associated gastrointestinal bleeding, may provide highly promising alternative to conventional LVADs limitations.

We hypothesized that the absence of physiological variation in flow associated to edema and venous stasis in manual mode contributed to a microvascular lesion. Endothelial dysfunction and impaired angiogenesis may both contribute to microvascular dysfunction in all organs, for example, the kidney. Indeed, markers of endothelial dysfunction and angiogenesis are predictor of disease severity in heart failure,²² in renal failure,²³ and after cardiac surgery.²⁴ Circulating biomarkers of endothelial activation and/or lesion can be both cause and consequence of microvascular dysfunction. Several human and animal studies have suggested involvement of endothelial and angiogenic factors imbalance in kidney disease and in particular acute or chronic renal dysfunction. Progressive renal dysfunction is observed in patients implanted with the C-TAH in manual mode in contrast to patients implanted with the C-TAH in autoregulated mode. However, when we analyzed all biomarkers with a linear mixed model, no significant relation was observed with creatinine levels, in contrast to protein levels. Concerning renal dysfunction in patients with manual mode, presence of early intermittent hemofiltration in these patients might affect the endothelial integrity and, therefore, may influence observed differences. Effect of early intermittent hemofiltration and effect on long-term follow-up in patients receiving C-TAH need to be confirmed in large cohort of patients. Association between endothelial dysfunction and protein levels are in line with endothelial dysfunction already described in edema processes and sodium handling. Indeed, sodium, accumulated with stasis, is able to bind to the endothelial glycocalyx and to induce its disruption, resulting in vascular dysfunction.²⁵ Absence of cardiac output adaptation to venous return is probably at the origin of endothelial dysfunction and increased permeability that gives rise to edema. Because of these edemas, diuretics are used sometimes with high doses and can induce hemoconcentration and hyperproteinemia. Since the manual mode does not allow compen-

sation of this edema and hemoconcentration, the endothelial dysfunction observed and its correlation to protein levels could be linked to this absence of venous returns adaptation. Another adaptation mechanism of volemia and hemoconcentration could be done by natriuretic peptides (NPs). Indeed, NPs are major contributor of heart–kidney interaction including inhibition of sodium reabsorption by inhibiting multiple plasma vasoconstrictors and also the counteraction of renin–angiotensin–aldosterone system. However, we previously described that C-TAH implantation abolished circulating concentration of NPs.²⁶ Thus, no regulation of hemoconcentration by NPs can be achieved after C-TAH implantation.

In our prospective cohort, we found a significant increase of sEndoglin and sEPCR after C-TAH in the manual mode. Both molecules are largely expressed on endothelial cells and have been described as a biomarker of endothelial dysfunction. sEPCR results from the cleavage of the entire extracellular domain mediated by TACE/ADAM17 or ADAM10.^{27,28} sEPCR levels have been found as biomarkers of damage to endothelial cells in plasma during sepsis, end-stage renal disease, preeclampsia, or in type 1 and 2 diabetes mellitus independently of inflammation.^{29,30} Binding of activated protein C (APC) to sEPCR interferes with binding of APC to phospholipids and hinders factor Va inactivation. Furthermore, binding of PC to sEPCR enhances APC generation, suggesting a procoagulant effect of sEPCR. Thus, increase of sEPCR could be associated to a procoagulant state and endothelial dysfunction in patients with a C-TAH in manual mode. Thus, in addition to its hemocompatibility, autoregulating the C-TAH mode could normalize the hemostatic balance and avoid an increased risk for thrombosis in these patients with cardiac failure and cardiac assistance, who already have a high risk factor for thrombosis.

Endoglin, alias CD105, is a transmembrane glycoprotein, known as an auxiliary receptor for TGF- β and expressed in vascular endothelium, with a key role in vascular physiology, angiogenesis, and vascular remodeling.³¹ The importance of endoglin in blood vessel biology is established in humans by the link between heterozygous mutations in the *ENDOGLIN* gene and the onset of hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 1 (HHT1). HHT1 is a vascular disease resulting in epistaxis, cutaneous and gastrointestinal telangiectasias, and pulmonary, cerebral, or hepatic arteriovenous malformation. Beyond the TGF- β -related effect, we previously described that endoglin can act as an adhesion molecule allowing adhesion between endothelial and perivascular cells³¹ and its soluble form could induce vessel destabilization by a competing effect with membrane endoglin.³¹ sEndoglin had the most significant odds ratio in our linear regression model with proteins adjusted on creatinine level. sEndoglin is shed from membrane-bound endoglin by the proteolytic activity of the matrix metalloprotease (MMP)-14³² and MMP-12³³; this shedding can be triggered by inflammation or endothelial injury. High levels of sEndoglin have been reported in several endothelium-related pathological conditions, among which is preeclampsia. Moreover, sEndoglin has been described to induce vascular permeability.³⁴ We recently confirmed endoglin involvement in vascular permeability in endoglin heterozygous mice and found a displayed higher number of permeabilization foci in

the blood retinal barrier.³⁵ In line with this, vascular permeability is a passive process that allows plasma to pass through the endothelium. Thus, increased sEndoglin observed in the manual mode of C-TAH could be at the origin of edema by this mechanism. Moreover, we demonstrated here in vitro, on ECFCs, that sEndoglin has antiangiogenic abilities with decreased pseudotubes formation, and a decreased ability to migrate. These antiangiogenic effects on vasculogenic cells, associated with previous effects described on permeability, are in line with an increase of endothelial dysfunction in C-TAH implanted patients, with the device being operated in manual mode. sEndoglin increase after C-TAH could contribute to microvascular dysfunction observed in one of the patients after C-TAH implantation in manual mode with appearance of cutaneous bleeding. Diseases such as HHT with mutation in endoglin gene have a similar phenotype with mucosal bleeding resulting mainly in epistaxis. Thus, taking into account that the adaptation to altered venous return in autoregulated mode allows preserving endothelial function, the absence of increased sEndoglin could also contribute to endothelial preservation and protection against edema. In the same manner that microparticles have been described to be a consequence of endothelial dysfunction and at the origin of endothelial damage, sEndoglin could be both the cause and/or the consequence of endothelial dysfunction. Finally, venous stasis is a consequence of absence of adaptation of cardiac output to alterations/variations in venous return. This venous stasis has been described to upregulate some MMP.³⁶ Thus, increase in sEndoglin and sEPCR, whose cleavage depends of metalloproteases, could be a consequence of venous stasis. Our results on the relation between protein levels, sEPCR, and sEndoglin are in line with this hypothesis.

In terms of angiogenic or mobilizing cytokines, we found an increase in SDF-1. SDF-1 is one of the main cytokines involved in stem cell mobilization, such as in hematopoietic stem cells, endothelial progenitor cells, or very small embryonic-like stem cells.^{7,37} We previously observed an endothelial cell deposition on top of blood-contacting surfaces inside the C-TAH.¹ The source of endothelial cells, grown on the C-TAH membrane, is likely to result from the mobilization of stem or progenitor cells, instead of migration from adjacent vessels, since there is no physical connection of the C-TAH to the patient's blood vessels. Thus, this increase of SDF-1, mainly observed after autoregulated C-TAH implantation, could improve endothelialization of xenopericardial tissue with vasculogenic circulating stem or progenitor cells.³⁸ The limitation of our study is the low number of patients in the long-term follow-up in patients in the manual mode. Increasing the number of patients implanted with C-TAH will allow us to further validate the potential confounding factors of renal function and inflammation in long-term follow-up.

In conclusion, in this study we have demonstrated that bioprosthetic artificial heart implantation with a key landmark of fully pulsatile flow and autoregulated mode provides a better conservation of endothelial homeostasis with the absence of endothelial-related damage (as resumed in ►Fig. 2) and an increase of SDF-1 known to mobilize stem and/or progenitor cells. These features are contrasting with endothelial damage

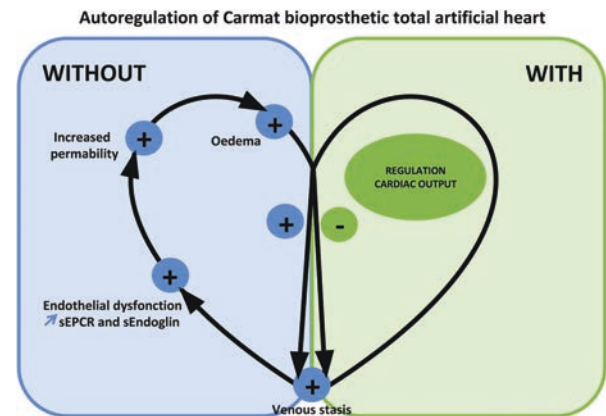


Fig. 2 Role of autoregulation of pulsatile bioprosthetic total artificial heart in regulation of venous congestion.

observed with C-TAH in manual mode or disorders generically associated with conventional LVADs therapy. Thus, autoregulated mode function along with the enhanced biocompatibility features of the C-TAH may usher in a new era of practically physiological heart replacement therapy.

What is known about this topic?

- The use of mechanical circulatory support, and in particular left ventricular assist devices (LVAD) is associated with a poor hemocompatibility characterized with thrombosis and bleedings.
- Pulsatile Carmat bioprosthetic total artificial heart (C-TAH) is designed to be implanted in patients with biventricular end-stage heart failure.
- C-TAH was first managed in the manual mode with a constant cardiac output but is now used with autoregulated mode where the output is modulated by venous return.
- Flow variation might contribute to endothelial dysfunction; endothelial dysfunction after bioprosthetic total artificial heart implantation remains largely unknown.

What does this paper add?

- We describe the beneficial effect of C-TAH used in autoregulated mode on endothelial biomarkers as compared with C-TAH implantation with manual mode.
- Implantation of C-TAH in manual mode is associated with increase of sEPCR and sEndoglin after implantation.
- After adjustment on the mode of C-TAH, creatinine level or inflammation, sEndoglin, and sEPCR, were found significantly associated with plasma total protein levels.
- Soluble endoglin is involved in vitro to a significant decrease in pseudotubes formation and migration ability in endothelial colony forming cells (ECFCs).
- We propose the systematic use of autoregulated mode of C-TAH since favorable impact of blood flow variation allow decreased endothelial dysfunction.

Authors' Contributions

D.M.S. supervised the work, analyzed the data, and wrote the paper. R.C. analyzed the data and performed statistical analysis. E.R. and L.M. performed and analyzed ECFC in vitro assays. B.P., C.P., N.G., and J.R. performed analysis and analyzed data. C.G. performed analysis, analyzed data, and wrote the paper. Y.P., M.B., J.C.R., M.K., P.I., C.L., and I.N. included patients and reviewed the paper. C.L. and I.N. are principal investigator, respectively, of feasibility and pivotal study. C.G. and P.G. analyzed the data and reviewed the paper. A.C., J.C.P., and P.J. organized clinical trials. A.C. is inventor of C-TAH and reviewed the paper.

Funding

This work was supported by CARMAT.

Conflict of Interest

D.M.S. received consulting fees from CARMAT and received institutional research support related to the CE Mark Study conduct. R.C. has nothing to declare. E.R. has nothing to declare. B.P. has received a research grant from CARMAT. Y.P. received consulting fees from CARMAT. M.B. has nothing to declare. C.P. has nothing to declare. J.R. has nothing to declare. J.C.R. has nothing to declare. M.K. has nothing to declare. N.G. has nothing to declare. L.M. has nothing to declare. A.C., J.C.P., and P.J. are employed by CARMAT. P.G. has nothing to declare. P.I. received consulting fees from CARMAT and received institutional research support related to the CE Mark Study conduct. C.G. received consulting fees from CARMAT. A.C. is cofounder and shareholder of CARMAT. C.L. received consulting fees from CARMAT. C.G. has nothing to declare. I.N. received institutional research support related to the CE Mark Study conduct.

Acknowledgments

We would like to thank the medical and nursing staff of cardiovascular intensive care units, cardiology and surgery departments involved in the patient's follow-up.

References

- Smadja DM, Saubaméa B, Susen S, et al. Bioprosthetic total artificial heart induces a profile of acquired hemocompatibility with membranes recellularization. *J Am Coll Cardiol* 2017;70(03):404–406
- Smadja DM, Susen S, Rauch A, et al. The Carmat bioprosthetic total artificial heart is associated with early hemostatic recovery and no acquired von Willebrand syndrome in calves. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2017;31(05):1595–1602
- Latrémouille C, Carpentier A, Leprince P, et al. A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: results from a pilot study. *J Heart Lung Transplant* 2018;37(01):33–37
- Richez U, De Castilla H, Guerin CL, et al. Hemocompatibility and safety of the Carmat total artificial heart hybrid membrane. *Heliyon* 2019;5(12):e02914
- Bizouarn P, Roussel JC, Trochu JN, Perlès JC, Latrémouille C. Effects of pre-load variations on hemodynamic parameters with a pulsatile autoregulated artificial heart during the early post-operative period. *J Heart Lung Transplant* 2018;37(01):161–163
- Rodrigo GC, Herbert KE. Regulation of vascular function and blood pressure by circadian variation in redox signalling. *Free Radic Biol Med* 2018;119:115–120
- Silvestre JS, Smadja DM, Lévy BI. Postischemic revascularization: from cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiol Rev* 2013;93(04):1743–1802
- Hoefer IE, den Adel B, Daemen MJ. Biomechanical factors as triggers of vascular growth. *Cardiovasc Res* 2013;99(02):276–283
- Rossi E, Poirault-Chassac S, Bieche I, et al. Human endothelial colony forming cells express intracellular CD133 that modulates their vasculogenic properties. *Stem Cell Rev Rep* 2019;15(04):590–600
- Nevo N, Lecourt S, Bièche I, et al. Valproic acid decreases endothelial colony forming cells differentiation and induces endothelial-to-mesenchymal transition-like process. *Stem Cell Rev Rep* 2020;16(02):357–368
- d'Audigier C, Susen S, Blandinieres A, et al. Eglf7 represses the vasculogenic potential of human endothelial progenitor cells. *Stem Cell Rev Rep* 2018;14(01):82–91
- Smadja DM, Melero-Martin JM, Eikenboom J, Bowman M, Sabatier F, Randi AM. Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *J Thromb Haemost* 2019;17(07):1190–1194
- Delafont B, Carroll K, Vilain C, Pham E. Investigation of mixed model repeated measures analyses and non-linear random coefficient models in the context of long-term efficacy data. *Pharm Stat* 2018;17(05):515–526
- Edwards LJ. Modern statistical techniques for the analysis of longitudinal data in biomedical research. *Pediatr Pulmonol* 2000;30(04):330–344
- Carpentier A, Latrémouille C, Cholley B, et al. First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: report of two cases. *Lancet* 2015;386(10003):1556–1563
- Kang J, Hennessy-Strahs S, Kwiatkowski P, et al. Continuous-flow LVAD support causes a distinct form of intestinal angiodyplasia. *Circ Res* 2017;121(08):963–969
- Randi AM, Smith KE, Castaman G. von Willebrand factor regulation of blood vessel formation. *Blood* 2018;132(02):132–140
- Tabit CE, Chen P, Kim GH, et al. Elevated angiotensin-2 level in patients with continuous-flow left ventricular assist devices leads to altered angiogenesis and is associated with higher nonsurgical bleeding. *Circulation* 2016;134(02):141–152
- Vincent F, Rauch A, Loobuyck V, et al. Arterial pulsatility and circulating von Willebrand factor in patients on mechanical circulatory support. *J Am Coll Cardiol* 2018;71(19):2106–2118
- Tabit CE, Coplan MJ, Chen P, Jeevanandam V, Uriel N, Liao JK. Tumor necrosis factor-alpha levels and non-surgical bleeding in continuous-flow left ventricular assist devices. *J Heart Lung Transplant* 2018;37(01):107–115
- Mancini D, Monteagudo J, Suárez-Fariñas M, et al. New methodologies to accurately assess circulating active transforming growth factor-β1 levels: implications for evaluating heart failure and the impact of left ventricular assist devices. *Transl Res* 2018;192:15–29
- Bank AJ, Lee PC, Kubo SH. Endothelial dysfunction in patients with heart failure: relationship to disease severity. *J Card Fail* 2000;6(01):29–36
- Anderson CE, Hamm LL, Batuman G, et al. The association of angiogenic factors and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 2018;19(01):117
- Mansour SG, Zhang WR, Moledina DG, et al; TRIBE-AKI Consortium. The association of angiogenesis markers with acute kidney injury and mortality after cardiac surgery. *Am J Kidney Dis* 2019;74(01):36–46

- 25 Oberleithner H, Riethmüller C, Schillers H, MacGregor GA, de Wardener HE, Hausberg M. Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(41):16281–16286
- 26 Arrigo M, Vodovar N, Nougué H, et al. The heart regulates the endocrine response to heart failure: cardiac contribution to circulating neprilysin. *Eur Heart J* 2018;39(20):1794–1798
- 27 Qu D, Wang Y, Esmo NL, Esmo CT. Regulated endothelial protein C receptor shedding is mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM17. *J Thromb Haemost* 2007;5(02):395–402
- 28 Lécuyer H, Virion Z, Barnier JP, et al. An ADAM-10 dependent EPCR shedding links meningococcal interaction with endothelial cells to purpura fulminans. *PLoS Pathog* 2018;14(04): e1006981
- 29 Zaghoul A, Al-Bukhari TA, Al-Pakistani HA, et al. Soluble endothelial protein C receptor and high sensitivity C reactive protein levels as markers of endothelial dysfunction in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus: their role in the prediction of vascular complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2014;106(03): 597–604
- 30 Saposnik B, Peynaud-Debayle E, Stepanian A, et al. Elevated soluble endothelial cell protein C receptor (sEPCR) levels in women with preeclampsia: a marker of endothelial activation/damage? *Thromb Res* 2012;129(02):152–157
- 31 Rossi E, Bernabeu C, Smadja DM. Endoglin as an adhesion molecule in mature and progenitor endothelial cells: a function beyond TGF- β . *Front Med (Lausanne)* 2019;6:10
- 32 Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, et al. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation* 2012;126(22):2612–2624
- 33 Aristorena M, Gallardo-Vara E, Vicen M, et al. MMP-12, secreted by pro-inflammatory macrophages, targets endoglin in human macrophages and endothelial cells. *Int J Mol Sci* 2019;20(12):20
- 34 Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, et al. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med* 2006;12(06):642–649
- 35 Rossi E, Smadja DM, Boscolo E, et al. Endoglin regulates mural cell adhesion in the circulatory system. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(08): 1715–1739
- 36 Jacob MP, Cazaubon M, Scemama A, et al. Plasma matrix metalloproteinase-9 as a marker of blood stasis in varicose veins. *Circulation* 2002;106(05):535–538
- 37 Smadja DM. Bone marrow very small embryonic-like stem cells: new generation of autologous cell therapy soon ready for prime time? *Stem Cell Rev Rep* 2017;13(02):198–201
- 38 Guerin CL, Loyer X, Vilar J, et al. Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: evidence of vasculogenic potential. *Thromb Haemost* 2015;113(05):1084–1094



Multidimensional Proteomic Approach of Endothelial Progenitors Demonstrate Expression of KDR Restricted to CD19 Cells

Coralie L. Guerin^{1,2,3} · Léa Guyonnet^{1,2,3} · Guillaume Goudot⁴ · Dominique Revets³ · Maria Konstantinou³ · Anna Chipont³ · Richard Chocron^{5,6} · Adeline Blandinieres^{1,7} · Lina Khider⁴ · Jeanne Rancic^{1,8} · Christophe Peronino^{1,7} · Benjamin Debuc^{1,9} · Audrey Cras^{1,10} · Camille Knosp⁵ · Christian Latremouille^{1,11} · Antoine Capel¹² · Markus Ollert³ · Jean-Luc Diehl^{1,8,13} · Piet Jansen¹² · Benjamin Planquette^{1,8,14} · Olivier Sanchez^{1,8,14} · Pascale Gaussem^{1,15} · Tristan Mirault^{5,16} · Alain Carpentier^{1,11} · Nicolas Gendron^{1,7} · David M. Smadja^{1,7,17}

Accepted: 18 October 2020

© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Endothelial progenitor cells (EPCs) are involved in vasculogenesis and cardiovascular diseases. However, the phenotype of circulating EPCs remains elusive but they are more often described as CD34⁺KDR⁺. The aim of the study was to extensively characterize circulating potential vasculogenic stem cell candidates in two populations of patients with cardiovascular disease by powerful multidimensional single cell complementary cytometric approaches (mass, imaging and flow). We identified cellular candidates in one patient before and after bioprosthetic total artificial heart implantation and results were confirmed in healthy peripheral and cord blood by mass cytometry. We also quantified cellular candidates in 10 patients with different COVID-19 severity. Both C-TAH implantation and COVID-19 at critical stage induce a redistribution of circulating CD34⁺ and CD19⁺ sub-populations in peripheral blood. After C-TAH implantation, circulating CD34⁺ progenitor cells expressed c-Kit stem marker while specific subsets CD34⁺CD133^{-/+}CD45^{-/dim}c-Kit⁺KDR⁻ were mobilized. KDR was only expressed by CD19⁺ B-lymphocytes and CD14⁺ monocytes subpopulations in circulation. We confirmed by mass cytometry this KDR expression on CD19⁺ in healthy peripheral and cord blood, also with a VE-cadherin expression, confirming absence of endothelial lineage marker on CD34⁺ subtypes. In COVID-19, a significant mobilization of CD34⁺c-Kit⁺KDR⁻ cells was observed between moderate and critical COVID-19 patients regardless CD133 or CD45 expression. In order to better evaluate EPC phenotype, we performed imaging flow cytometry measurements of immature CD34⁺KDR⁺ cells in cord blood and showed that, after elimination of non-circular events, those cells were all CD19⁺. During COVID-19, a significant mobilization of CD19⁺KDR⁺ per million of CD45⁺ cells was observed between moderate and critical COVID-19 patients regardless of CD34 expression. CD34⁺c-Kit⁺ cells are mobilized in both cardiovascular disease described here. KDR cells in peripheral blood are CD19 positive cells and are not classic vasculogenic stem and/or progenitor cells. A better evaluation of c-Kit and KDR expressing cells will lead to the redefinition of circulating endothelial progenitors.

Keywords Stem cells · Endothelial progenitors · C-kit · VEGFR-2/KDR · Bioprosthetic total artificial heart · COVID-19

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10062-1>.

This article belongs to the Topical Collection: *Special Issue on COVID-19 Pandemic and Stem Cells*

Guest Editor: Mariusz Z. Ratajczak

✉ David M. Smadja
david.smadja@aphp.fr

Extended author information available on the last page of the article

Abbreviations

CD	cluster of differentiation
COVID-19	coronavirus disease 2019
EPCs	Endothelial progenitor cells
C-TAH	Carmat total artificial heart
HSNE	Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 of Severe Acute Respiratory Syndrome
SC	stem cells

SPADE	Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events
UMAP	Uniform Manifold Approximation and Projection
VSELS	very small embryonic like stem cells

Introduction

Endothelial progenitor cells (EPCs) are described as a subpopulation of circulating CD34⁺ and/or CD133⁺ stem cells (SC) expressing mainly VEGFR-2 receptor (KDR in human). Conventional flow cytometric immunophenotyping has been widely described and used in most cases 3 to 4 markers (CD34, CD133, KDR, CD45) [1]. While EPCs origin remain controversial, we recently described that human bone marrow very small embryonic-like stem cells (VSELS) were able to differentiate into endothelial cells and to promote post-ischemic revascularization [2]. VSELS are major pluripotent SC defined as cells of small size being Lineage-negative, CD133-positive or CD34 positive, and CD45-negative [3]. Since EPCs and VSELS are extremely rare and their exact phenotype is still a matter of debate, more information with multiparametric proteomic is essential to decipher their exhaustive pattern. Mass cytometry (CyTOF) offers an interesting approach to address this issue, as it allows the simultaneous analysis of millions of cells with up to 40 metal tagged antibodies [4]. Since EPCs and/or VSELS can be mobilized in several ischemic or regenerative situations [2, 5], we addressed their characterization using a multidimensional proteomic single-cell approach in two different clinical settings.

First, stem and/or progenitor cells mobilization could be observed after implantation of bioprosthetic materials to acquire hemocompatibility. Indeed, Carmat bioprosthetic total artificial heart (C-TAH) is a biventricular pump that has been developed for end-stage heart failure patients [6]. We previously demonstrated an acquired hemocompatibility with a progressive endothelialization of the device membrane [7]. We hypothesized that endothelial cells found in the C-TAH come from the circulating blood since there is no physical connection between the device and patient blood vessels. Second, stem and/or progenitor cells mobilization can be observed during infection. Coronavirus 2 of Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS-CoV-2) infection leading to the coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a respiratory infection with a significant impact on the hematopoietic system [8]. We and others have shown that SARS-CoV-2 virus infect blood vessels and induce vascular damage [9–12]. The level of stem and/or progenitor cell mobilization in this context of viral infection associated to cytokine storm and endothelial lesion is currently unknown.

The aim of the study was to identify the distribution and phenotype of immune and potential circulating vasculogenic

SC after C-TAH implantation known to be endothelialized by circulating cells [7]. We demonstrated existence of those mobilized candidates in COVID-19 patients (moderate versus critical ill patients) by reference to the most immature compartment- i.e. cord blood. This approach is based on robust protocols of cytometry (mass, imaging and flow) and provide exhaustive phenotype of vasculogenic stem and progenitor cells for human clinical studies and models of vascular disease.

Methods

Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart (C-TAH) Study Design and Population

The patient presented here was included in a single-arm, prospective, non-blinded, non-randomized study conducted in 4 French centers as previously described [6]. The study was registered in the European Databank on Medical Devices (CIV-FR-13-09-011615). Here we report stem/progenitor cell mobilization in a 58-year-old man with dilated cardiomyopathy. Peripheral blood samples were collected on EDTA before (T1 at day 0), one week (T2 at day 6) and two weeks (T3 at day 13) after C-TAH implantation. Ficoll isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated, aliquoted, frozen and stored to assess deep immune phenotype by mass cytometry.

COVID-19 Study Design and Population

Consecutive patients referred to emergency department of Georges Pompidou European hospital in Paris (France) with suspected SARS-CoV-2 infection were prospectively included. Here we analyzed stem and progenitor cell signatures 7 days after first symptoms for all patients ($n = 5$ per group). Clinical and biological characteristics of patients included are described in Supplementary Tables 1 and 2. SARCODO study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients provided written informed consent before enrollment (CPP 2020-04-048 / 2020-A01048-31 / 20.04.21.49318).

Mass Cytometry

Defrost peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) or cord blood mononuclear cells (CBMCs) from density gradient centrifugation were re-suspended at a concentration of 10^7 cells/ml and stained with Cisplatin 5 μ M for 5 min (min) at room temperature (RT) to assess viability. After incubation with Fc Block, surface staining was performed by adding a cocktail of pre-conjugated and homemade-conjugated antibodies (Supplemental Table 3) for 30 min at RT as previously

described [13] and detailed in supplementary methods. Mass cytometry data were normalized using MatLab methods. For data cleaning, live cell population was extracted as a new .fcs file and uploaded on Cytobank platform to run unsupervised analysis using Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events (SPADE) algorithm. SPADE algorithm [14] generates trees illustrating the hierarchical relationship between clusters of cells based on a density-dependent down-sampling followed by agglomerative clustering to prevent rare cells from being overlooked among the more abundant cellular population. Based on the same clustering approach, CD34⁺ population was analyzed with the Hierarchical Stochastic Neighbor Embedding (HSNE) algorithm designed to identify rare cell populations and to visualize cellular distribution with a density-based mode. HSNE dimension reduction-based algorithm generates a hierarchical representation that keeps the non-linear high-dimensional relationships between cells based on the similarity of all marker expressions simultaneously. As not mandatory, we choose not to perform down sampling step. The HSNE is implemented in the integrated single-cell analysis framework Cytosplore+ HSNE.

Imaging Cytometry

CBMNCs samples were thawed slowly and resuspended in FACS Buffer for counting. Fluorescent staining (complete, monocolors and fluorescent minus one controls FMOs) were performed at 4 °C with Fc Block and for 30 min with anti-human antibodies cocktail of anti-lineage, CD45, CD14, CD19, CD34, CD133, VEGFR2 and Zombie dye (Supplemental Table 4). Cells were washed prior to acquisition with ImageStreamX at 60x magnification, low speed and high sensitivity.

Imaging flow cytometry data were analysed with IDEAS software. Cells were first selected by being well focused (Gradient-RMS of Brightfield channel), then singlets were selected using Brightfield Area and Aspect Ratio. Dead cells were excluded by Zombie NIR positive staining. CD34⁺ and KDR⁺ cells were identified based on respective patterns for CD14 and CD19 according to FMOs controls.

Flow Cytometry

PBMNCs and CBMNCs samples were thawed slowly and resuspended in FACS Buffer for counting. Fluorescent staining was performed at 4 °C with Fc Block and for 30 min with anti-human antibodies cocktail of anti-lineage, CD45, c-Kit, CD19, CD34, CD133, VEGFR2 and Zombie dye (Supplemental Table 4). Cells were washed and fixed prior to acquisition with BD Fortessa Cytometer.

Data were first analyzed in a supervised way with FlowJo to perform live lineage negative cells down sampling and concatenation of the subsequent files. Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) algorithm [15] was performed to apply dimension reduction to the data while well preserving their global structure.

Statistical Analysis

Continuous data were expressed as median [interquartile range: (IQR)] and categorical data as proportion. Patients were compared according to level of care (hospitalization in conventional medical unit or hospitalization directly in ICU). In univariate analysis, we determined the differences in median using the unpaired t-test (Mann-Whitney U test) for continuous variable and differences in proportions were assessed with the Chi-square test or Fischer exact test if necessary. All analyses were 2-sided and a *p* value of *p* < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using R studio software (R Development Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Results

Bioprosthetic C-TAH Implantation Induces Redistribution of Circulating Immune Cells and Mobilization of SC in Peripheral Blood

PBMNCs from C-TAH implanted patient were successively collected before (T1) and after surgery (T2 and T3). Deep immunophenotyping by mass cytometry was performed to assess circulating immune populations and to focus on stem and progenitor cell subsets which play a key role in neo-vascularization. Using mass cytometry data, unsupervised SPADE algorithm was applied to design trees in order to identify major circulating populations. Figure 1a illustrates the distribution of the immune circulating populations identified based on sequential expression patterns for multiple clusters of differentiation. In Fig. 1b, a drastic reduction in circulating CD4⁺ T-lymphocytes was observed one week post-engraftment with a return to basal values at two weeks while the level of CD8⁺ T-lymphocytes remained equal over time. CD19⁺ B-lymphocytes population showed a strong increase one week after implantation before going back to pre-implantation level at T2. Natural killer (NK) CD56⁺ cells were divided into two subpopulations according to CD57⁺ expression related to their activation status. Both activated and non-activated NK cell populations displayed the same percentages and patterns of evolution over time points with a slight increase at T3. Classical CD14⁺CD16⁻ monocytes were mobilized one week after C-TAH implantation while pro-

inflammatory intermediate and non-classical monocytes $CD16^+$ remained at very low levels. After 2 weeks at T3, classical monocytes tended to pre-implantation levels while $CD14^-CD16^-$ tended to slightly increase. Figure 1c, the sub-population of circulating $CD34^+$ increased by 1.35 fold two weeks after transplantation. Thus, $CD34^+$, $CD19^+$ and $CD14^+$ sub-populations were mobilized in peripheral blood after C-TAH implantation.

Circulating $CD34^+$ Cells Are Negative for KDR

The three mobilized subpopulations $CD34^+$, $CD19^+$ and $CD14^+$ populations were extracted from the circulating cells SPADE trees from C-TAH patient and concatenated per time-point to design a stem cell and progenitor focused SPADE tree (Fig. 2a). Eight subpopulations were subsequently identified based on their differential phenotype considering the positivity for $CD34$, $CD133$, $CD45$, $CD14$, $CD11c$, $CD19$ and $CD20$

markers. Among the $CD34^+$ populations, four subpopulations were identified based on their respective expression of $CD133$ and $CD45$ – i.e. $CD34^+CD45^-CD133^-$, $CD34^+CD45^-CD133^+$, $CD34^+CD45^{dim}CD133^-$ and $CD34^+CD45^{dim}CD133^+$. Then, $CD14$ expressing monocytes were divided in two sub-populations according to $CD11c$ levels – i.e. $CD14^+CD11c^+$ and $CD14^+CD11c^{low}$ – while B-lymphocytes were sorted on presence or absence of $CD20$ expression – i.e. $CD19^+CD20^-$ and $CD19^+CD20^+$. For each sub-population, expression level of markers of stem cells (Oct-3/4, c-Kit, FcεR1, $CD13$ and $CD49F$), mesenchymal cells ($CD90$) and endothelial cells (KDR) were assessed at T1 as well as those of $CD31$ (PECAM-1) expressed by endothelial and leukocyte subsets and $CD105$ (endoglin) expressed by mesenchymal lineage.

The same strategy was applied to selected $CD34^+$, $CD19^+$ and $CD14^+$ subpopulations from healthy PBMNCs and CBMNCs samples and identified by mass cytometry.

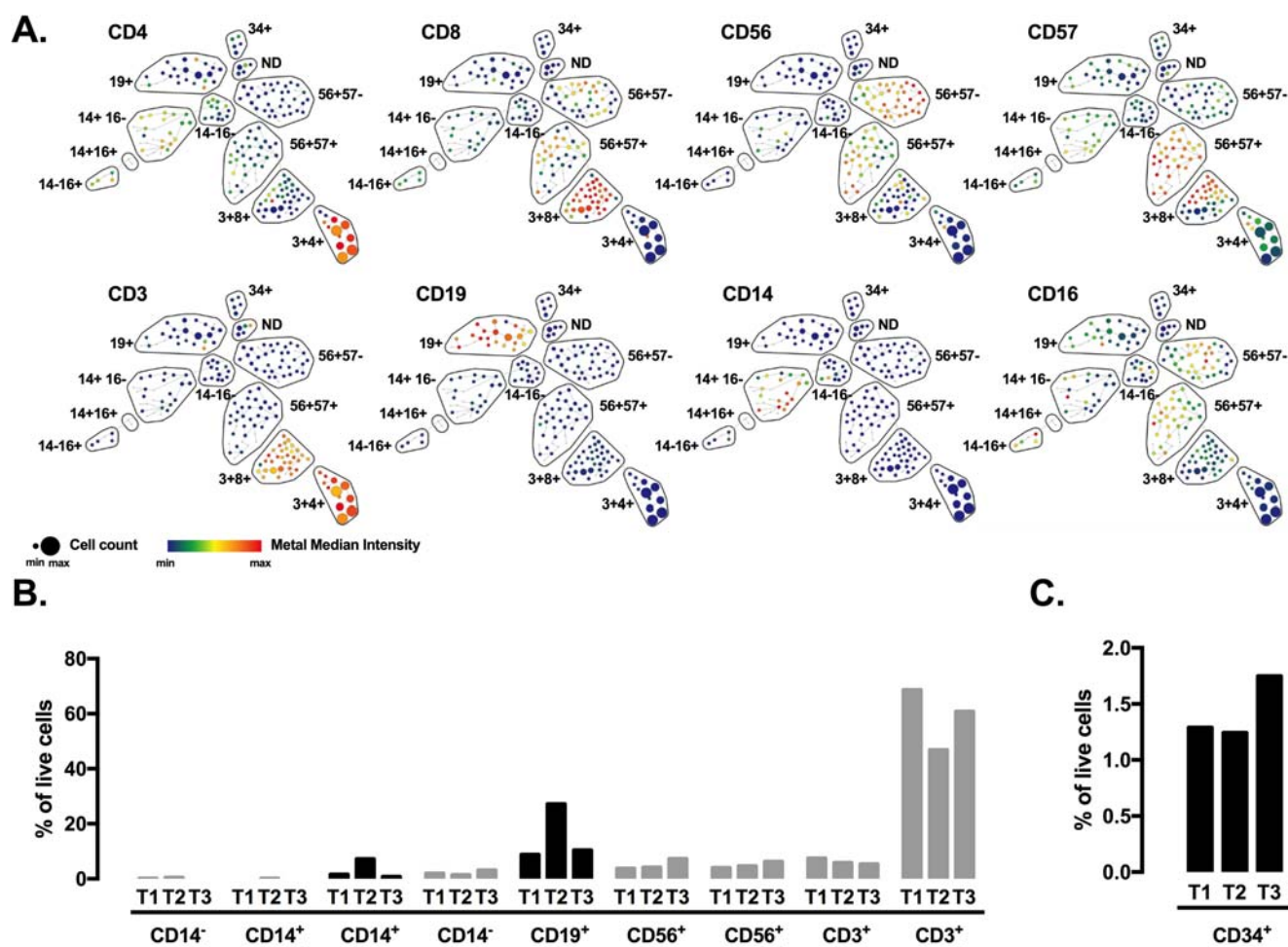


Fig. 1 Redistribution of circulating immune cells in peripheral blood after C-TAH implantation. a Identification of live peripheral blood nuclear cell populations using SPADE unsupervised analysis and displayed by major immune markers. b Evolution overtime of major

lymphoid and myeloid cell populations, expressed in percentages of live cells. c Level of $CD34^+$ cells expressed in percentages of live cells overtime

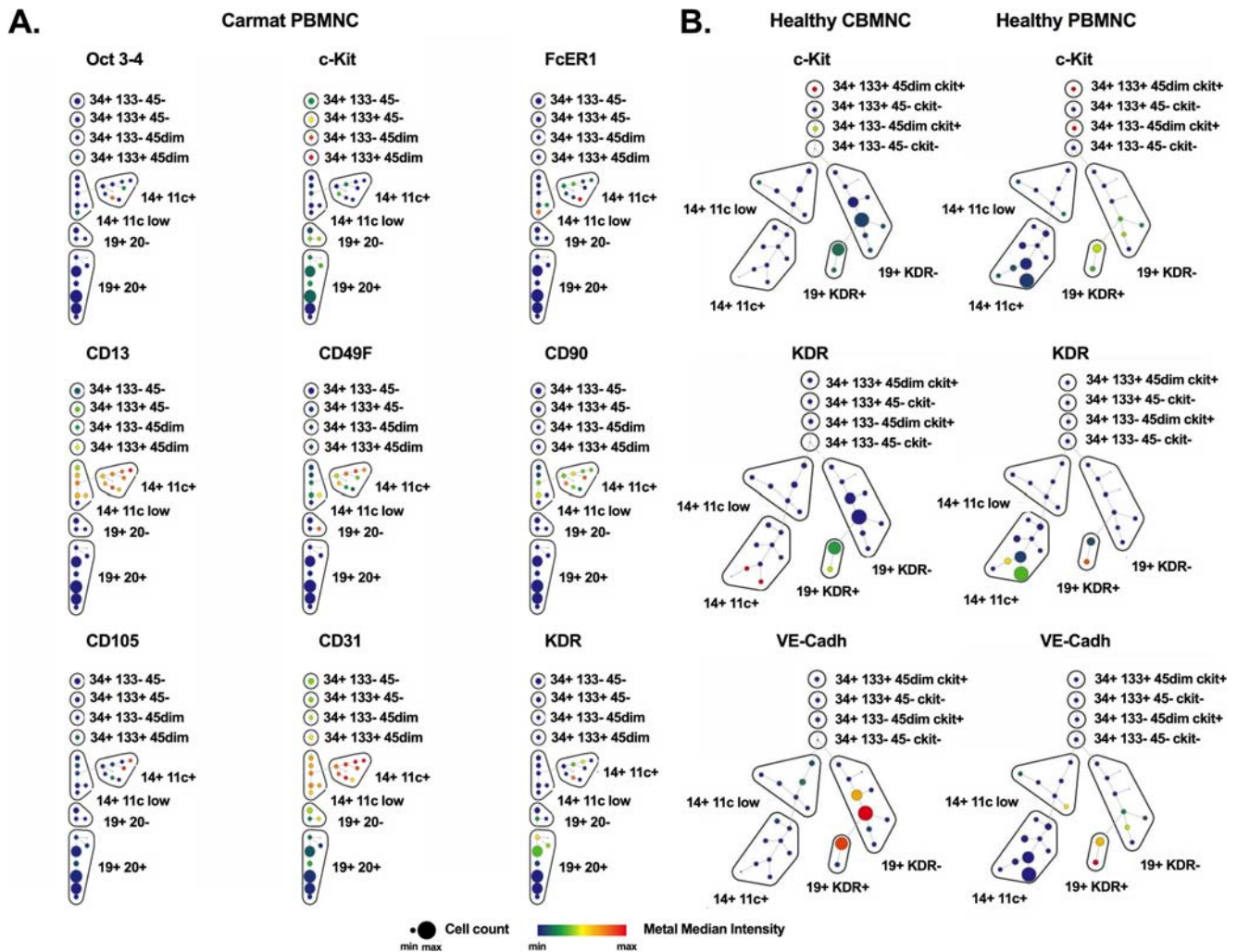


Fig. 2 Expression of stem, mesenchymal and endothelial markers in CD34⁺, CD19⁺ and CD14⁺ sub-populations. a Phenotypical signature within stem cell and progenitor focused SPADE tree in CD34⁺, CD19⁺ and CD14⁺ sub-populations of C-TAH patient at T1. b Phenotypical

signature within stem cell and progenitor focused SPADE tree in CD34⁺, CD19⁺ and CD14⁺ sub-populations of healthy CBMNCs and PBMNCs

Cellular profiles observed with C-TAH were confirmed in healthy samples in Fig. 2b and expression of c-Kit, KDR and VE-Cadherin assessed endothelial pattern of CD19⁺ cells by revealing VE-Cadherin expression in CD19⁺ cells and its absence in CD34⁺ cells.

In C-TAH patient, kinetic of expression for selected markers was then assessed per subpopulation as illustrated at T1 (basal expression levels) in Fig. 3 with black bars scaled on the maximal expression per marker among populations from the stem/progenitor cells focused SPADE tree. At T1, all CD34⁺ sub-populations expressed c-Kit, CD13 and CD49F SC markers as well as CD31 but only the CD133⁺ expressed Oct-3/4 stem transcription factor. None of the CD34⁺ stems and progenitor populations expressed the KDR by contrast to CD19⁺ and CD14⁺CD11c^{low} sub-populations that showed also positive expressions for some stem, mesenchymal or endothelial markers. Thus, prior to implantation of C-TAH, KDR

was only expressed by CD19⁺ B-lymphocytes and CD14⁺ monocytes subpopulations but not by CD34⁺ subpopulations in circulation.

CD34⁺c-Kit⁺ progenitor cells are mobilized after C-TAH implantation.

Expression variations for discriminative marker to T1 over T2 and T3 time-points are illustrated for each subpopulation in the Fig. 3 heat-map with a color code (blue decrease / white stability / red increase). Over the kinetic, positive expressions of KDR remained identical in CD19⁺ cells and increased in both CD14⁺ sub-populations while keeping a negative expression in all the CD34⁺ sub-populations. Independently of CD133 and CD45 levels of expression, CD34⁺ sub-populations showed the same variation pattern of expression along time points with an increase of CD13 and CD31 at T2 before a decrease at T3. While the CD34⁺CD45⁻CD133⁻ never expressed

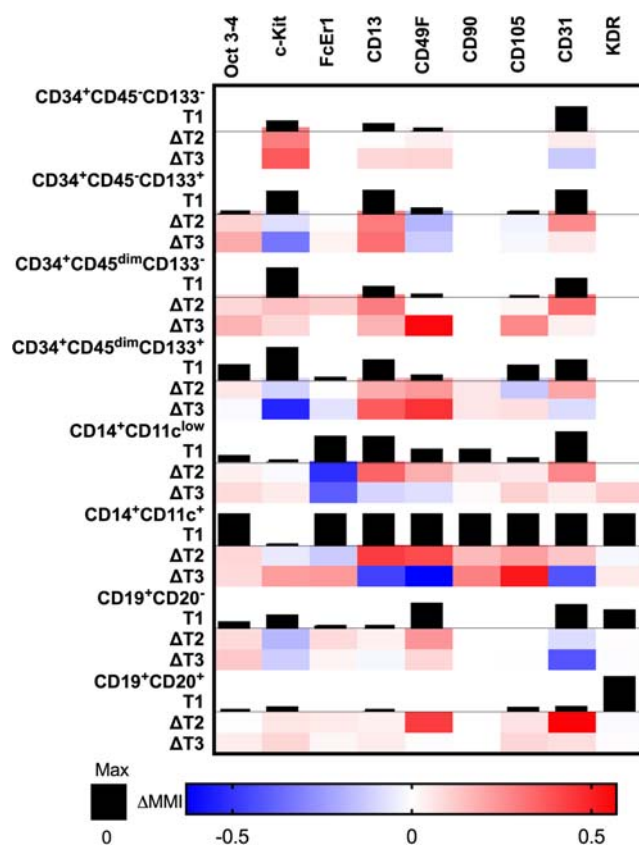


Fig. 3 Evolution of stem, mesenchymal and endothelial markers over time in mobilized CD34⁺, CD19⁺ and CD14⁺ sub-populations. Pre-implantation (T1) levels of maximal relative expression for clusters of differentiation and transcription factors sorted by population subsets (black bars) associated to post-implantation variation (heat-map with a color code: blue decrease / white stability / red increase) expressed in Median Metal Intensity relative variation to T1 ($\Delta T2$, $\Delta T3$)

Oct3/4 and CD105, other sub-populations displayed an increase of both markers over time. CD105 mesenchymal marker is increasing within the CD45^{dim} sub-populations whereas c-Kit stem marker is increasing only within the CD133⁻ stem/progenitor sub-populations whatever CD45⁻ or CD45^{dim} expression.

We further explored the display of CD34, CD133 and CD45 with the HSNE map in Fig. 4a of merged T1, T2 and T3, CD34⁺ populations allows, based on differential patterns of intensities, the identification of four CD34⁺ subsets with expression profiles A, B, C and D confirming those previously identified (respectively A: CD34⁺CD45⁻CD133⁻, B: CD34⁺CD45⁻CD133⁺, C: CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻ and D: CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺). To identify all of the populations represented through the different kinetic times, it is necessary to consider the data as a whole by pooling all the points making it possible to highlight each of the populations independently of their presence / absence at a given time. This approach that does not rely on kinetic attests the global absence of expression of KDR in CD34⁺ cells and confirms the ability of the CD34⁺CD45^{dim} cells to highly express c-Kit. Among

CD34⁺ population, the HSNE cellular density visualization per time point in Fig. 4b underlines the redistribution of the four CD34⁺ subsets as quantified in Fig. 4c and emphasizes a mobilization of the CD34⁺CD45^{dim}c-Kit⁺ whatever expression of CD133. None of stem/progenitor populations mobilized after C-TAH implantation expressed KDR.

CD34⁺c-Kit⁺ Progenitor Cells Are Mobilized in COVID-19 Critical Patients

Since COVID-19 has been described as hypoxic condition associated with strong vascular dysfunction, we decided to explore cells phenotype characterized in mass cytometry previously in a 10 COVID-19 patients cohort with moderate and critical severity.

Supervised analysis of flow cytometry data confirmed the presence of the previously identified CD34⁺ subpopulations based on their CD45, CD133 and c-Kit expression in peripheral blood of both groups of COVID-19 patients as well as in healthy cord blood samples. The statistical analysis showed, in a first approach, that among the four populations of CD34⁺CD45⁻CD133^{-/+}, only the CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ was significantly mobilized ($p = 0.022$) in COVID-19 critical patients compared to moderate ones (Fig. 5a-d). The CD34⁺CD45⁻CD133^{-/+} populations could be sub-divided into two categories according to the positivity of c-Kit. There was no difference between moderate and critical COVID-19 in the CD34⁺CD45⁻CD133^{-/+}c-Kit^{+/+} (Fig. 5b-c). A highly significant increase of the CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺c-Kit⁺ ($p = 0.008$) was observed (Fig. 5f) while no difference existed in the CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺c-Kit⁻ population (Fig. 5e). To identify stem and progenitor cells expressing KDR in COVID-19 and CB-MNCs samples among the selected live lineage negative cells, four populations based on distinct patterns of both CD34 and KDR were assessed as illustrated in Fig. 5g and respective profile for CD45 and CD133 were observed. We observed that, regardless CD34 level, KDR⁺ cells are 100% CD45^{high} expressing cells.

CD34⁺ KDR⁺ CD19⁻ Are all Non-circular Events

Consensual phenotypic definition of circulating EPCs relies on expression of CD34 and KDR markers simultaneously. First, we have shown in COVID-19 patient peripheral blood that KDR was only expressed by CD45^{high} cells, and second, that in peripheral blood of C-TAH patient, KDR was only expressed by B cells and monocytes, both CD45^{high} expressing cells. Therefore, we analyzed the phenotype of from cord-blood for CD14 and CD19 markers by imaging flow cytometry that enable us to localize fluorescence and to have a clear picture of the cells morphology on the top of conventional flow cytometry data. As illustrated in the gating strategy of the Fig. 6a, CD34⁺KDR⁺ focused live circular single cells are

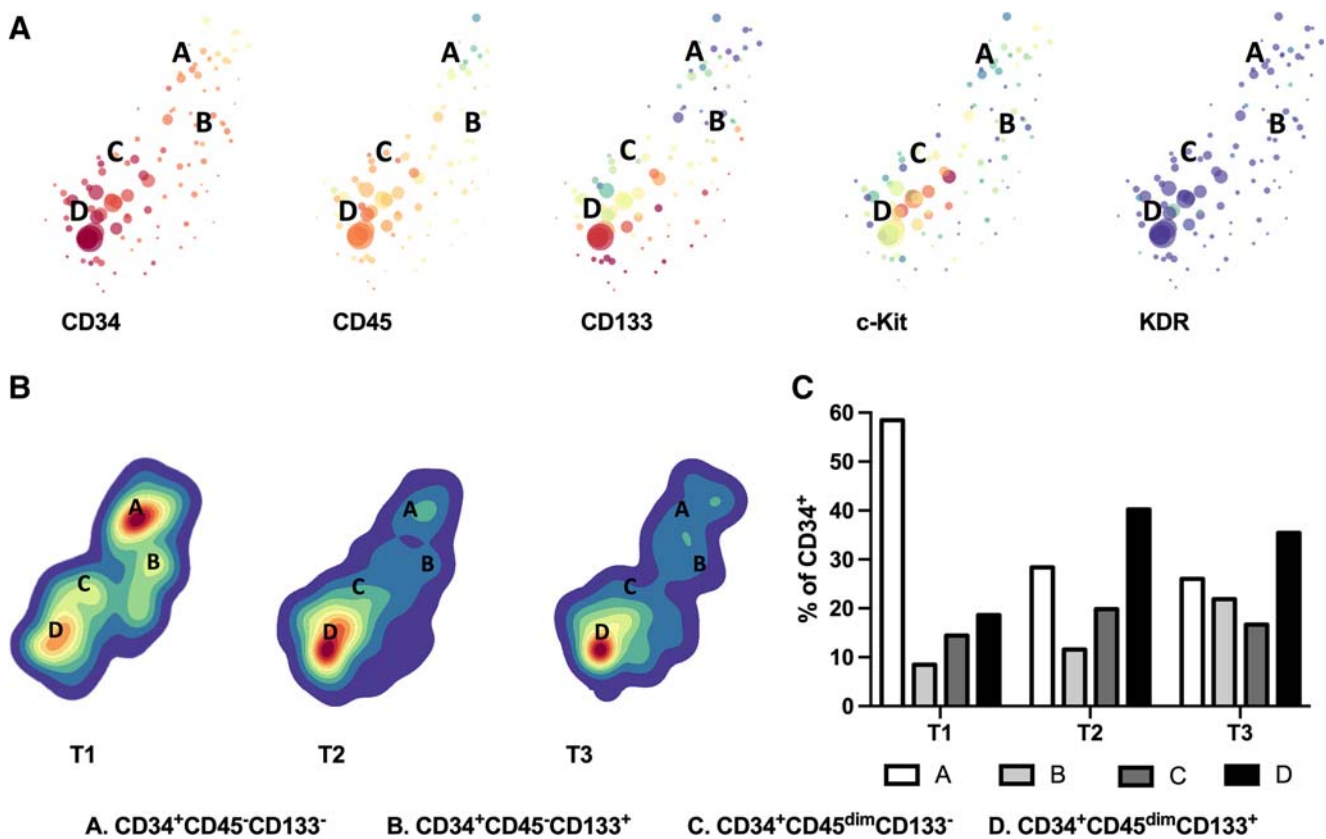


Fig. 4 Mobilization of stem cells in peripheral blood post C-TAH implantation. **a** Cartography of CD34⁺ sub-populations identified as **a**, **b**, **c** and **D** based on their CD133 and CD45 differential patterns and correlated with KDR and c-Kit expression using unsupervised HSNE

algorithm. **A:** 34⁺45⁻133⁻, **B:** 34⁺45⁻133⁺, **C:** 34⁺45^{dim}133⁻ and **D:** 34⁺45^{dim}133⁺. **b** Distribution profiles of HSNE mapped CD34⁺ subsets visualized in cell density at T1, T2 and T3. **c** Repartition of A, B, C and D populations over time points

positive only for CD19 marker. Some non-circular events were expressing the double positivity for CD34 and KDR but, based on their shape in Fig. 6b, were not intact biological events of interest as cells in suspension from cord blood are expected to be round. Figure 6c and d confirm that in circular events, all cells positive for KDR were CD19⁺ cells whatever expression of CD34⁺.

CD19⁺KDR⁺ Cells Are Mobilized in COVID-19 Critical Patients

Flow cytometry analysis performed on moderate and critical COVID-19 MNCs from peripheral and healthy cord blood samples showed a comparable level of CD19⁺ whatever the expression of CD34 in each group (Fig. 7a). A significant mobilization of CD19⁺KDR⁺ per million of CD45⁺ cells was observed between moderate and critical COVID-19 patients ($p < 0.001$) in Fig. 7b, regardless of CD34 level, negative ($p < 0.0001$) or positive ($p = 0.001$). Data of the resulting clusters are visualized on a UMAP plot in Fig. 7c showing all single cells of the live lineage negative events selected from down sampled files concatenated per group where CD19⁺

KDR⁺ population from respective group are overlapped in blue on the UMAP.

Discussion

Using a multidimensional proteomic single-cell approach, we analyzed two different clinical models of cardiovascular disease with CD34⁺ mobilization and demonstrated (i) that a subset of these cells was CD34⁺c-Kit⁺KDR⁻, and (ii) that all cells positive for VEGFR-2/KDR cells in peripheral blood were CD19⁺B-lymphocytes in cardiovascular and infectious diseases.

This study was motivated by data from the past 20 years aiming at identifying EPCs in blood by conventional flow cytometry approaches. Authors generally defined EPCs as cells positive for the KDR in the lymphocyte gate. However, this cell population can be challenged since no correlation has been reported between the number of these circulating cells and the number of endothelial colonies forming cells (ECFCs) obtained in cell culture [16, 17]. Of note, ECFCs are considered by

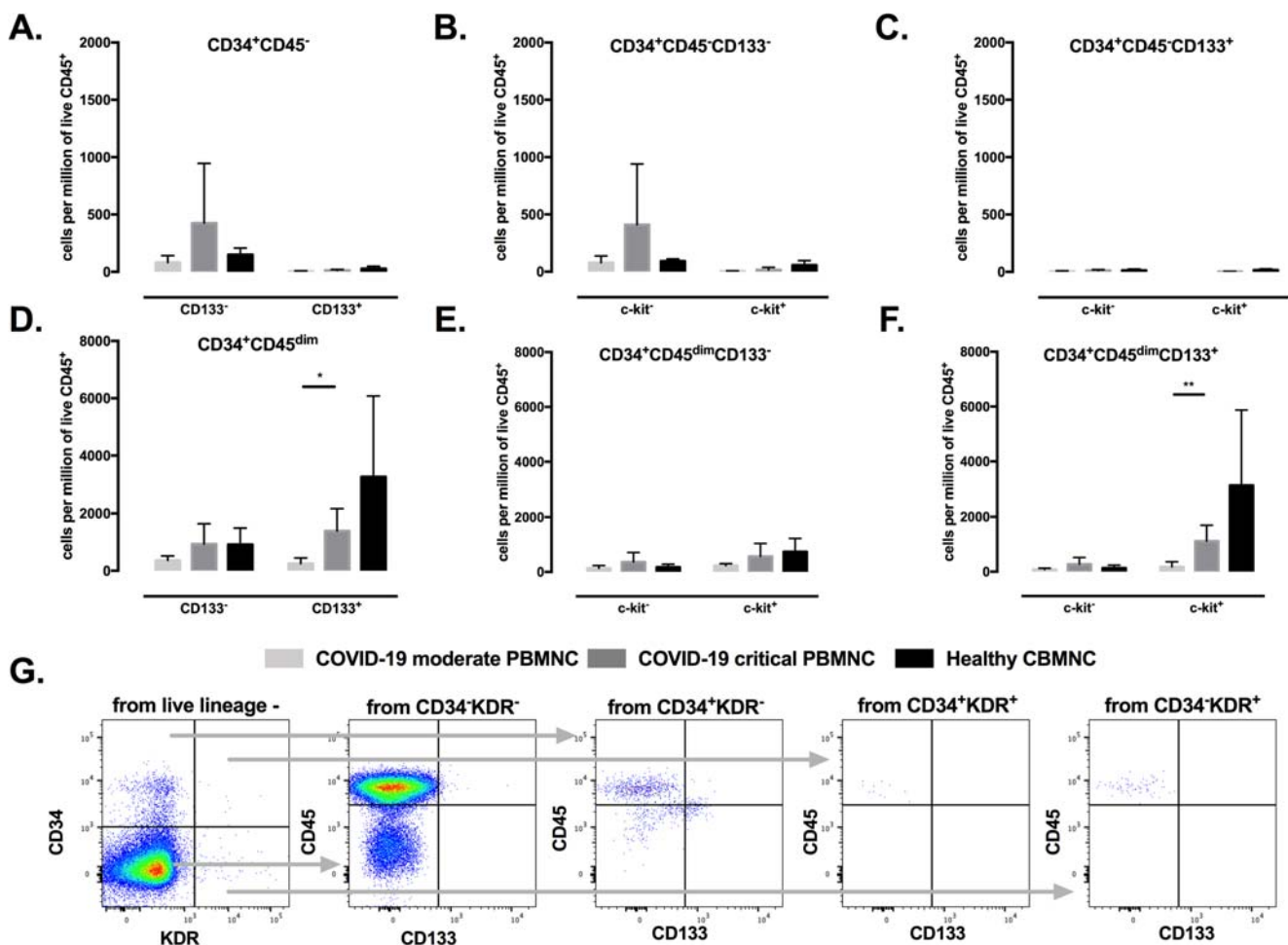


Fig. 5 Mobilization of stem cells in peripheral blood in critical COVID-19 patients. **a** Quantification of CD34⁺CD45⁻CD133⁻ or CD133⁺ cells expressed per million of live CD45⁺ cells in peripheral blood of COVID-19 moderate and critical patients and in healthy cord blood samples. **b** Quantification of c-Kit⁺ or c-Kit⁻ cells among the CD34⁺CD45⁻CD133⁻ population. **c** Quantification of c-Kit⁺ or c-Kit⁻ cells among the CD34⁺CD45⁻CD133⁺ population. **d** Quantification of CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ or CD133⁻ cells expressed per million of live CD45⁺ cells. **e** Quantification of c-Kit⁺ or c-Kit⁻ cells among the

CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻ population. **f** Quantification of c-Kit⁺ or c-Kit⁻ cells among the CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ population. **g** Illustration of CD34 and KDR of live lineage negative cells in peripheral blood of COVID-19 patients - Among the live cells, each of the 4 populations based on respective expressions of CD34 and KDR are phenotype on the CD45 and CD133 markers thus illustrating that all the KDR⁺ events are exclusively CD45^{high} CD133⁻ **p* < 0.05; ***p* < 0.01.

consensus as true endothelial progeny derived from circulating progenitors [18]. In a recent meta-analysis reporting pooled data on the association between levels of circulating progenitor cells, cardiovascular outcomes and death, CD34⁺ and CD34⁺CD133⁺ were the most frequent cell population associated with cardiovascular outcomes and death. CD34⁺ were therefore proposed as the best candidate for a clinical-grade biomarker of cardiovascular risk [19]. However, the pathophysiology link between CD34⁺ vasculogenic potential and outcomes remain largely speculative.

Interestingly, we described a progressive endothelialization of the bioprosthetic membrane of the C-TAH that could be at the origin of its acquired hemocompatibility [7]. Since there is no physical connection to between membrane bioprostheses to

patient blood vessels, the source of these neo-endothelial cells in the C-TAH would come from the circulating blood. In the present study, one patient receiving C-TAH could be explored at different time-points; we evidenced a mobilization of CD34⁺ cells by mass cytometry analyzed with SPADE algorithm. It provided a unique opportunity to comprehensively characterize circulating vasculogenic stem and progenitor cells at the single cell level in a complex environment. After implantation of bioprosthetic total artificial heart, we show a global increase of CD133 stem marker in all CD34⁺ cells associated to an increase over time of Oct3/4 and c-Kit in CD34⁺CD133⁺ cells subpopulations. Thus, newly formed endothelial cells observed on top of bioprosthetic tissue inside C-TAH could be issued from this CD34⁺c-Kit⁺ subpopulation. Indeed, CD34⁺c-Kit⁺ populations have already been

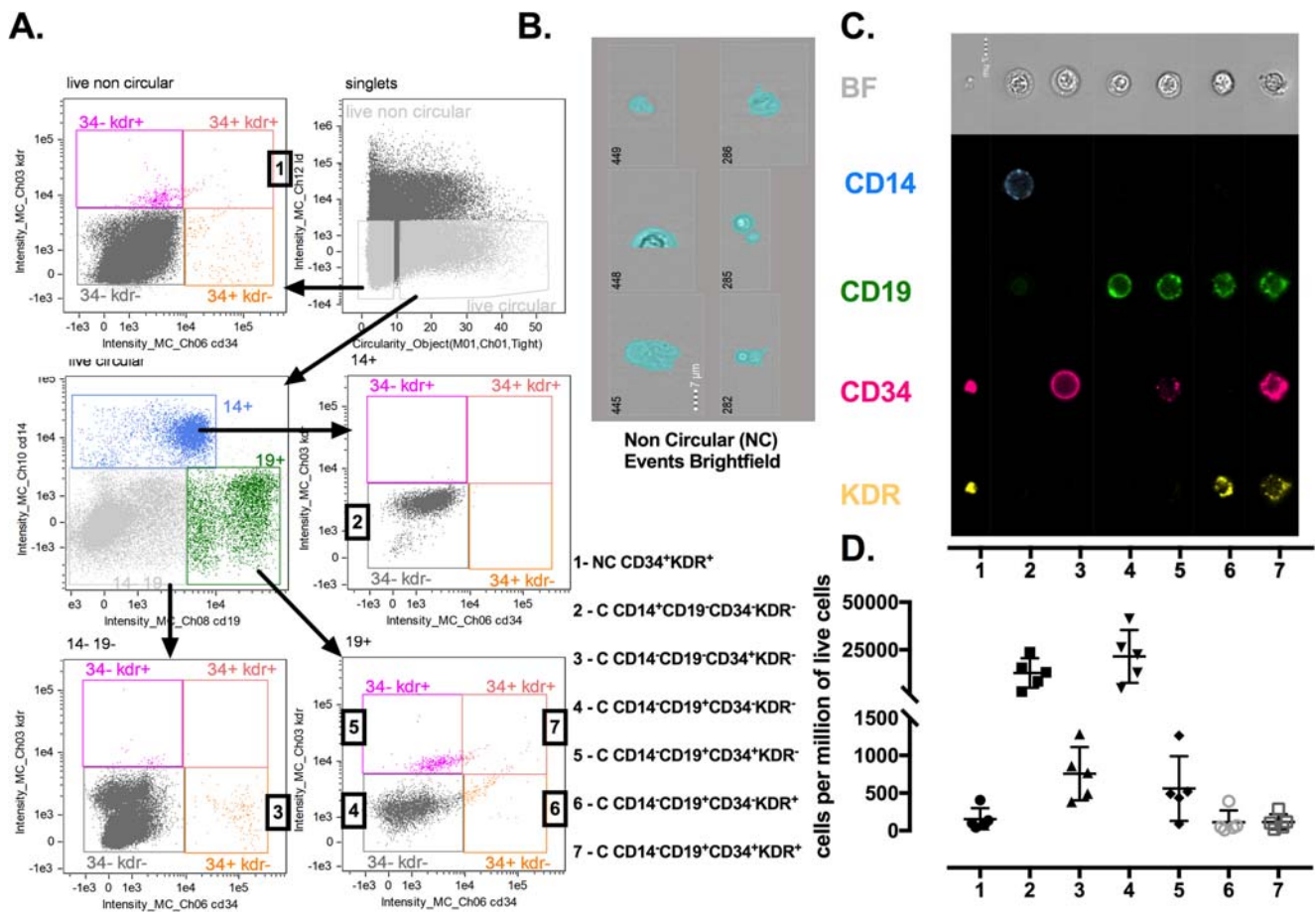


Fig. 6 CD34⁺KDR⁺ phenotypic analysis in cord blood by imaging cytometry. **a** Image flow cytometry gating strategy (focus/singlets/live circular/ CD14 or CD19 / CD34 or KDR) with identification of several populations as non-circular (NC) in 1, circular (C) CD14⁺ in 2, C CD14⁻CD19⁻CD34⁻KDR⁻ in 3 and CD34⁺KDR⁻ in 4, C CD14⁻CD19⁺CD34⁻KDR⁻ in 5 and CD34⁺KDR⁺ in 6 and the last C

CD14⁻CD19⁺CD34⁺KDR⁺ in 7. **b** Visualization of the brightfield of the non-circular events by imaging flow cytometry. **c** Visualization of the non-circular and circular events from population 1 to 7 by imaging flow cytometry and associated phenotype for CD14, CD19, CD34 and KDR. **d** Quantification of populations 1 to 7 per millions of live cells in CBMNCs

described to have endothelial differentiation potential *in vivo* [20] and CD133⁺c-Kit⁺lin⁻ cells from human cord blood have also already been described to have ability to differentiate in ECFCs [21]. Potential mobilization of these cells in critical COVID-19 could provide endothelial regeneration helpful during hypoxia observed in COVID-19 patients [22, 23], but on the other hand could participate to dissemination of thrombotic profile observed in clinic [8]. Indeed, we recently described that ECFCs can be potential actor of procoagulant process [24].

Surprisingly, with our multiparametric analysis, we were not able to identify circulating EPCs usually defined as CD34⁺KDR⁺ in peripheral blood. Herein, mass and imaging flow cytometry panels demonstrated that all KDR positive cells are either B-lymphocytes CD19⁺ or monocytes CD14⁺ in patient's peripheral blood and healthy peripheral and cord blood. KDR expression in monocyte could correspond to so-called early-EPC (circulating angiogenic cells) well described in early 2000 in

particular by Dimmeler's group. This subpopulation is able to modify angiogenic process by secreting growth factors but has not the ability to form endothelial cells in culture [5].

KDR has been described in hematopoietic stem cells (HSCs) to play a crucial role in hematopoiesis [25]. HSCs have been described to be in CD34⁺KDR⁺ cell fraction defining KDR as a positive functional marker for HSCs, without definition of their CD19 status. Our results demonstrate that KDR is expressed by CD19⁺ cells (that are supposed to be B lymphocytes) and monocytes, without any significant modulation after C-TAH implantation in contrast to critical form of COVID-19. We confirmed our results in CB-MNCs with a flow cytometry approach and studying circularity of single cells. As described here, CD34⁺KDR⁺ are mostly debris [26] and/or non-circular events whose size is compatible with flow gating strategy including lymphocytes used in most of previously performed clinical studies. Thus, we confirmed

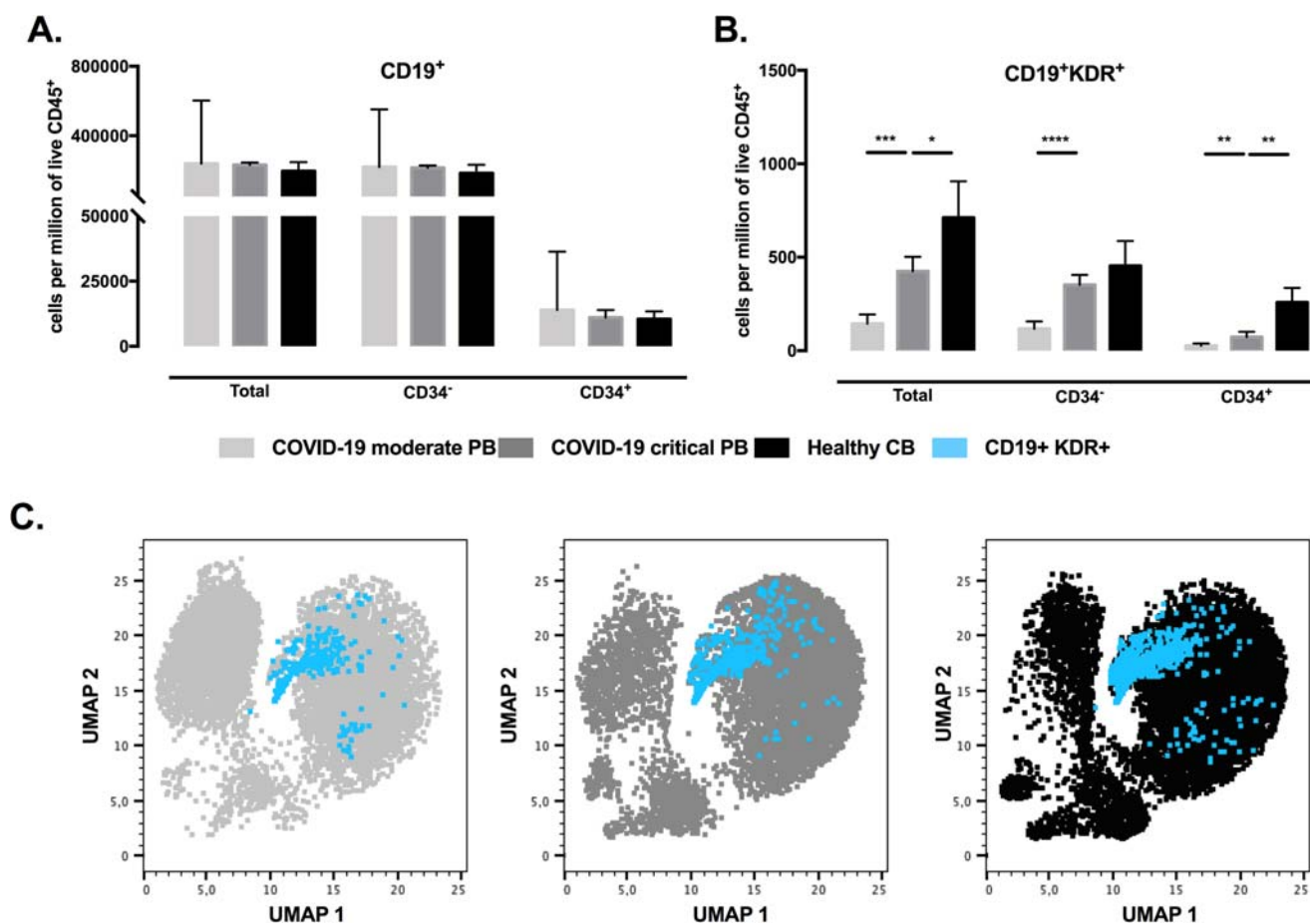


Fig. 7 CD19⁺KDR⁺ cells are mobilized in peripheral blood of COVID-19 critical patients. **a** Quantification of CD34⁻ and CD34⁺ cells of the CD19⁺ population and expressed per million of live CD45⁺ cells in peripheral blood of COVID-19 moderate and critical patients and in healthy cord blood samples. **b** Quantification of CD34⁻ and CD34⁺ cells of the CD19⁺KDR⁺ population and expressed per million of live CD45⁺

cells. **c** UMAP visualization of the CD19⁺KDR⁺ (in blue) of down sampled live lineage negative population concatenated per condition, i.e. COVID-19 moderate (light grey), COVID-19 critical (dark grey) and healthy cord blood (black). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

that KDR is never expressed on circular CD19 negative cells, whatever expression of CD34⁺ cells. In cord blood, circular CD34⁺KDR⁺ are all CD19⁺. CD34⁺CD19⁺ are rare event in peripheral blood supposed to be pre-B cells [27]. Thus, in conventional flow, cell circularity is not assessed. This circularity feature is crucial parameter for identification of circulating rare events. CD19⁺ cells are involved in both innate and adaptive immune responses through both antibody-dependent and antibody-independent mechanisms. B lymphocytes have been proposed leading to enhanced myocardial inflammation, tissue injury and deterioration of myocardial function [28]. Our new data proposing that KDR cells are CD19 cells reshuffle the cards of EPCs involvement in cardiovascular field and also emphasize involvement of B cell in cardiovascular events and death [29].

We confirmed all phenotype of CD34⁺ and CD19⁺ cells observed in C-TAH patients in healthy peripheral and cord blood with mass cytometry and demonstrated their existence in COVID-19 patients. COVID-19 is a respiratory infection with a significant impact on the hematopoietic system and hemostasis [8]. Current hallmarks of COVID-19 are the cytokine storm, coagulopathy and endothelial dysfunction [8]. This cytokine release syndrome in COVID-19 patients is associated to a decreased count of lymphocyte [30]. This lymphopenia has been related to a significant decrease in T cells (in particular CD8⁺ T cells) and this significant decrease of T lymphocyte subset is positively correlated with in-hospital death and severity of illness [8]. Here we show that total CD19⁺ cells are not modulated in COVID-19 patients along the disease, while CD19⁺KDR⁺ cells are increased in critical form in contrast to moderate form of the disease. B lymphocytes have also been proposed to be involved

in COVID-19, since patients with a gammaglobulinemia lacking B lymphocytes had a mild clinical course in contrast to COVID-19 patients with common variable immune deficiency [31]. Thus, phenotyping approach enabled us to identify a new circulating actor positive for the CD19 antigen associated with an endothelial KDR⁺ and VE-cadh⁺ phenotype. Future work will assess the role of the KDR⁺ and endothelial lineage marker along the B progeny, in particular in human B cell memory, as actor or as key mediator in lymphopoiesis and/or vasculogenic processes.

We found that mobilized CD34⁺CD133⁺ cells after C-TAH implantation are enriched in c-Kit expression. Human or mouse c-Kit SC from different organs have been described to be able to differentiate into endothelial cells [32]. Before C-TAH implantation, c-Kit is expressed in all CD34⁺ cells. After implantation, c-Kit decreases in the CD133⁺ cells while it increases in CD34⁺CD133⁻CD45^{-dim} subpopulations. VSELs are major pluripotent small size SC defined in humans as Lineage-negative, CD133 positive or CD34 positive, and CD45 negative cells [3] but their exhaustive simultaneous phenotype for CD34 and CD133 is not yet well assessed. VSELs CD133⁺ or CD34⁺ have been shown in several studies to have multilineage differentiation ability into cells from different germ layers [3]. We and others have previously shown their ability to differentiate in endothelial cells [2]. CD34⁺VSELs express c-Kit since KIT ligand have been recently described to enhance their expansion [3]. Thus, these CD34⁺CD133⁻CD45⁻c-Kit⁺ cells could correspond to VSEL and recolonize pericardial to form endothelial cells observed [7]. We also found that mobilized CD34⁺CD133⁺CD45⁻ cells after C-TAH implantations are significantly enriched in oct3/4 expression. The only circulating cells expressing markers of pluripotent SC Oct-4 are VSELs. Indeed, Oct-4 positive VSEL have been described to express CD34 or CD133, and are negative for lineage markers and the pan-hematopoietic marker CD45 [3]. Thus, mobilization of c-Kit and oct3/4 positive cells could be reflecting VSEL mobilization after C-TAH implantation, and give rise to endothelialization of C-TAH membrane.

We also found CD34⁺CD133⁺CD45^{dim}c-Kit⁺ cells mobilization in COVID-19 patients. Since endothelial lesion have been described in COVID-19 [9–12], mobilization of this stem cell subpopulation from bone marrow and/or vessels and/or white adipose tissue could be triggered by this vascular dysfunction or cytokine storm. Beyond vascularization repair, mobilization of multipotent SC c-Kit⁺ and/or VSELs could help organs recovery in C-TAH and COVID-19 patients. Indeed, mesenchymal stem cells have been proposed to modulate inflammation around endothelial cells during COVID-19 and also cure endothelial dysfunction to accelerate their recovery after COVID-19 induced vascular lesion and are currently tested in COVID-19 [8] (Stroma-Cov-2 project: NCT04333368). Since c-Kit⁺ and/or VSELs have the ability

to support vasculogenesis and give rise to hematopoietic cells to counteract lymphopenia and inflammation, this stem/progenitor cell mobilization in COVID-19 could be triggered by infection to counteract side effect of virus infection.

Limitation of the Study

Very small amount of KDR⁺ cells induce lots of technical problems with large variations and variability in different groups and require large number of events scored by flow cytometry which was as well a limitation in our C-TAH samples containing maximum 1 million cells dedicated to mass cytometry acquisition. MNCs from COVID-19 and CB-MNC flow cytometry quantification were normalized in cells per million of CD45⁺ cells to be compared but ficoll isolation of MNCs led to the loss of the neutrophils within samples. Our newly described populations of CD34⁺c-Kit⁺ and CD19⁺KDR⁺ need to be confirmed in larger cohort to explore correlation with cardiovascular outcomes. On a clinical point of view, C-TAH and COVID-19 patients explored here had heparin/LMWH therapy: in preventive dose in COVID-19 patients and therapeutic dose in C-TAH patient. We recently described anticoagulation as a preserving factor for endothelial lesion induced by COVID-19 [12]. Indeed, in 66 COVID-19 patients we found that patients with oral anticoagulation had a significant decrease in CECs. Thus, we cannot exclude an effect of heparin and/or LMWH on circulating endothelial compartment or their stem/progenitor cells.

In conclusion, bioprosthetic total artificial heart implantation and COVID-19 patients allowed us to fully characterize stem and progenitor cells in blood that could be at the origin of the endothelial recovery. Large phenotyping allowed us to demonstrate that non KDR cells with immaturity markers can be mobilized and confirmed absence of KDR on circulating stem/progenitor cells. This result needs to be explored to understand exact CD19⁺ KDR⁺ cells involvement in cardiovascular disease and endothelial differentiation.

Acknowledgements We would like to acknowledge all nurses, technicians and physicians involved in the Cardiac Surgery for C-TAH and Vascular medicine, Internal medicine, Respiratory medicine, Intensive care, Clinical investigation center and Hematology departments of the George Pompidou European Hospital in COVID-19 cohort for their help in taking care of patients and including them in the study. We thank AP-HP for promotion of the SARCODO Project. We thank the unit of clinical research URC HEGP CIC-EC1418 (Natacha Nohile, Pauline Jouany and Dr. Juliette Djadi-Prat) and Helene Cart-Grandjean from AP-HP for their involvement in SARCODO project.

Funding This work was supported by grants of the LIH, Carmat, PROMEX STIFTUNG FUR DIE FORSCHUNG foundation, ANR SARCODO, Fondation de France and Appel d'offre AP-HP mécénat crise COVID-19 From GHU APHP.CUP.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest A Carpentier is cofounder and shareholder of CARMAT SA. DMS and CL received consulting fees from CARMAT. A Capel and P. Jansen are employed by CARMAT SA.

References

- Mund, J. A., Estes, M. L., Yoder, M. C., Ingram Jr., D. A., & Case, J. (2012). Flow cytometric identification and functional characterization of immature and mature circulating endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *32*(4), 1045–1053.
- Guerin, C. L., Loyer, X., Vilar, J., Cras, A., Mirault, T., Gaussem, P., Silvestre, J. S., & Smadja, D. M. (2015). Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: Evidence of vasculogenic potential. *Thrombosis and Haemostasis*, *113*(5), 1084–1094.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., Suszynska, M., Miller, D. M., Kucia, M., & Shin, D. M. (2017). A novel view of the adult stem cell compartment from the perspective of a quiescent population of very small embryonic-like stem cells. *Circulation Research*, *120*(1), 166–178.
- Bendall, S. C., Nolan, G. P., Roederer, M., & Chattopadhyay, P. K. (2012). A deep profiler's guide to cytometry. *Trends in Immunology*, *33*(7), 323–332.
- Silvestre, J. S., Smadja, D. M., & Levy, B. I. (2013). Posts ischemic revascularization: From cellular and molecular mechanisms to clinical applications. *Physiological Reviews*, *93*(4), 1743–1802.
- Latremouille, C., Carpentier, A., Leprince, P., Roussel, J. C., Cholley, B., Boissier, E., et al. (2018). A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, *37*(1), 33–37.
- Smadja, D. M., Saubamea, B., Susen, S., Kindo, M., Bruneval, P., Van Belle, E., et al. (2017). Bioprosthetic Total artificial heart induces a profile of acquired Hemocompatibility with membranes Recellularization. *Journal of the American College of Cardiology*, *70*(3), 404–406.
- Debus, B., & Smadja, D. M. (2020). (2020). Is COVID-19 a new hematologic disease? *Stem Cell Reviews and Reports*, *12*, 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-09987-4>.
- Varga, Z., Flammer, A. J., Steiger, P., Haberecker, M., Andermatt, R., Zinkernagel, A. S., et al. (2020). Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*, 20.
- Smadja, D.M., Guerin, C.L., Chocron, R., Yatim, N., Boussier, J., Gendron, N., et al. (2020). Angiotensin-2 as a marker of endothelial activation is a good predictor factor for intensive care unit admission of COVID-19 patients. *Angiogenesis*, In press.
- Ackermann, M., Verleden, S. E., Kuehnel, M., Haverich, A., Welte, T., Laenger, F., et al. (2020). Pulmonary vascular endothelialitis, thrombosis, and angiogenesis in Covid-19. *The New England Journal of Medicine*, *383*(2), 120–128.
- Khider, L., Gendron, N., Goudot, G., Chocron, R., Hauw-Berlemont, C., Cheng, C., et al. (2020). Curative anticoagulation prevents endothelial lesion in COVID-19 patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1111/jth.14968>.
- Wierz, M., Pierson, S., Guyonnet, L., Viry, E., Lequeux, A., Oudin, A., et al. (2018). Dual PD1/LAG3 immune checkpoint blockade limits tumor development in a murine model of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *131*(14), 1617–1621.
- Qiu, P., Simonds, E. F., Bendall, S. C., Gibbs Jr., K. D., Bruggner, R. V., Linderman, M. D., Sachs, K., Nolan, G. P., & Plevritis, S. K. (2011). Extracting a cellular hierarchy from high-dimensional cytometry data with SPADE. *Nature Biotechnology*, *29*(10), 886–891.
- Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C. A., Kwok, I. W. H., Ng, L. G., et al. (2019). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature Biotechnology*.
- Smadja, D. M., Mauge, L., Nunes, H., d'Audigier, C., Juvin, K., Borie, R., et al. (2013). Imbalance of circulating endothelial cells and progenitors in idiopathic pulmonary fibrosis. *Angiogenesis*, *16*(1), 147–157.
- Mauge, L., Sabatier, F., Boutouyrie, P., D'Audigier, C., Peyrard, S., Bozec, E., Blanchard, A., Azizi, M., Dizier, B., Dignat-George, F., Gaussem, P., & Smadja, D. M. (2014). Forearm ischemia decreases endothelial colony-forming cell angiogenic potential. *Cytotherapy*, *16*(2), 213–224.
- Smadja, D. M., Melero-Martin, J. M., Eikenboom, J., Bowman, M., Sabatier, F., & Randi, A. M. (2019). Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, *17*(7), 1190–1194.
- Rigato, M., Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2016). Levels of circulating progenitor cells, cardiovascular outcomes and death: A meta-analysis of prospective observational studies. *Circulation Research*, *118*(12), 1930–1939.
- Li, T. S., Hamano, K., Nishida, M., Hayashi, M., Ito, H., Mikamo, A., Matsuzaki, M., et al. (2003). CD117+ stem cells play a key role in therapeutic angiogenesis induced by bone marrow cell implantation. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *285*(3), H931–H937.
- Cardenas, C., Kwon, J. Y., & Maeng, Y. S. (2016). Human cord blood-derived CD133(+)/C-kit(+)/Lin(-) cells have Bipotential ability to differentiate into Mesenchymal stem cells and outgrowth endothelial cells. *Stem Cells International*, *2016*, 7162160.
- Dhont, S., Derom, E., Van Braeckel, E., Depuydt, P., & Lambrecht, B. N. (2020). The pathophysiology of 'happy' hypoxemia in COVID-19. *Respiratory Research*, *21*(1), 198.
- Diehl, J. L., Peron, N., Chocron, R., Debus, B., Guerot, E., Hauw-Berlemont, C., et al. (2020). Respiratory mechanics and gas exchanges in the early course of COVID-19 ARDS: A hypothesis-generating study. *Annals of Intensive Care*, *10*(1), 95.
- Billoir, P., Blandinieres, A., Gendron, N., Chocron, R., Gunther, S., Philippe, A., et al. (2020). Endothelial colony-forming cells from idiopathic pulmonary fibrosis patients have a high procoagulant potential. *Stem Cell Reports*. <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10043-4>.
- Ziegler, B. L., Valtieri, M., Porada, G. A., De Maria, R., Muller, R., Masella, B., et al. (1999). KDR receptor: A key marker defining hematopoietic stem cells. *Science*, *285*(5433), 1553–1558.
- Cosette, J., Moussy, A., Paldi, A., & Stockholm, D. (2017). Combination of imaging flow cytometry and time-lapse microscopy for the study of label-free morphology dynamics of hematopoietic cells. *Cytometry. Part A*, *91*(3), 254–260.
- Bendall, S. C., Davis, K. L., Amir el, A. D., Tadmor, M. D., Simonds, E. F., Chen, T. J., et al. (2014). Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell*, *157*(3), 714–725.
- Zouggari, Y., Ait-Oufella, H., Bonnin, P., Simon, T., Sage, A. P., Guerin, C., et al. (2003). B lymphocytes trigger monocyte mobilization and impair heart function after acute myocardial infarction. *Nature Medicine*, *19*(10), 1273–1280.
- Werner, N., Kosiol, S., Schiegl, T., Ahlers, P., Walenta, K., Link, A., et al. (2005). Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *The New England Journal of Medicine*, *353*(10), 999–1007.
- Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., et al. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel


coronavirus: Implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395(10224), 565–574.

31. Quinti, I., Lougaris, V., Mito, C., Cinetto, F., Pecoraro, A., Mezzaroma, I., et al. (2020). A possible role for B cells in COVID-19?: Lesson from patients with Agammaglobulinemia. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 22.
32. Stanczuk, L., Martinez-Corral, I., Ulvmar, M. H., Zhang, Y., Lavina, B., Fruttiger, M., et al. (2017). cKit lineage hemogenic

endothelium-derived cells contribute to mesenteric lymphatic vessels. *Cell Reports*.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Coralie L. Guerin^{1,2,3} · Léa Guyonnet^{1,2,3} · Guillaume Goudot⁴ · Dominique Revets³ · Maria Konstantinou³ · Anna Chipont³ · Richard Chocron^{5,6} · Adeline Blandinieres^{1,7} · Lina Khider⁴ · Jeanne Rancic^{1,8} · Christophe Peronino^{1,7} · Benjamin Debuc^{1,9} · Audrey Cras^{1,10} · Camille Knosp⁵ · Christian Latremouille^{1,11} · Antoine Capel¹² · Markus Ollert³ · Jean-Luc Diehl^{1,8,13} · Piet Jansen¹² · Benjamin Planquette^{1,8,14} · Olivier Sanchez^{1,8,14} · Pascale Gaussem^{1,15} · Tristan Mirault^{5,16} · Alain Carpentier^{1,11} · Nicolas Gendron^{1,7} · David M. Smadja^{1,7,17} 

¹ Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Université de Paris, F-75006 Paris, France

² Cytometry Platform, Institut Curie, F-75006 Paris, France

³ Department of Infection and Immunity, Luxembourg Institute of Health, Strassen, Luxembourg

⁴ Vascular Medicine Department and Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, Université de Paris, F-75015 Paris, France

⁵ PARCC, INSERM, Université de Paris, F-75006 Paris, France

⁶ Emergency Department, AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁷ Hematology Department and Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁸ Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

⁹ Plastic Surgery Department, AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹⁰ Cell therapy Unit, AP-HP, Saint Louis Hospital, F-75010 Paris, France

¹¹ Cardiovascular Surgery Department and Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation) AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹² Carmat SA, Vélizy-Villacoublay, France

¹³ Intensive Care Department and Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹⁴ Respiratory Medicine department and Biosurgical Research Laboratory (Carpentier Foundation), AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹⁵ Hematology Department, AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹⁶ Vascular Medicine department, AH-HP, Georges Pompidou European Hospital, F-75015 Paris, France

¹⁷ European Hospital Georges Pompidou, Inserm UMR-S 1140, 20 rue Leblanc, 75015 Paris, France



Elevated Circulating Stem Cells Level is Observed One Month After Implantation of Carmat Bioprosthetic Total Artificial Heart

Léa Guyonnet¹ · Grégoire Detriché^{2,3} · Nicolas Gendron^{2,4} · Aurélien Philippe^{2,4} · Christian Latremouille⁵ · Lou Soret^{2,4} · Antoine Capel⁵ · Christophe Peronino^{2,4,5} · Piet Jansen⁵ · Peter Ivak⁶ · Alain Carpentier⁷ · Tristan Mirault^{8,3} · Ivan Netuka⁶ · Coralie L. Guerin^{1,2} · David M. Smadja^{2,4}

Accepted: 25 September 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

Abstract

The Aeson® total artificial heart (A-TAH) has been developed as a total heart replacement for patients at risk of death from biventricular failure. We previously described endothelialization of the hybrid membrane inside A-TAH probably at the origin of acquired hemocompatibility. We aimed to quantify vasculogenic stem cells in peripheral blood of patients with long-term A-TAH implantation. Four male adult patients were included in this study. Peripheral blood mononuclear cells were collected before A-TAH implantation (T0) and after implantation at one month (T1), between two and five months (T2), and then between six and twelve months (T3). Supervised analysis of flow cytometry data confirmed the presence of the previously identified Lin⁻CD133⁺CD45⁻ and Lin⁻CD34⁺ with different CD45 level intensities. Lin⁻CD133⁺CD45⁻, Lin⁻CD34⁺CD45⁻ and Lin⁻CD34⁺CD45⁺ were not modulated after A-TAH implantation. However, we demonstrated a significant mobilization of Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} ($p=0.01$) one month after A-TAH implantation regardless of the expression of CD133 or c-Kit. We then visualized data for the resulting clusters on a uniform manifold approximation and projection (UMAP) plot showing all single cells of the live Lin⁻ and CD34⁺ events selected from down sampled files concatenated at T0 and T1. The three clusters upregulated at T1 are CD45^{dim} clusters, confirming our results. In conclusion, using a flow cytometry approach, we demonstrated in A-TAH-transplanted patients a significant mobilization of Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} in peripheral blood one month after A-TAH implantation.

Keywords Stem cells · Endothelial progenitors · Aeson · Total artificial heart · Mobilization · Transplantation

Introduction

The Aeson® total artificial heart (A-TAH, Carmat, Velisy Villacoublay, France) has been developed as a total heart replacement for patients at risk of death from biventricular failure [1]. The A-TAH is a biventricular, autoregulated, pulsatile, electro-hydraulically actuated heart replacement device with

Léa Guyonnet and Grégoire Detriché contributed equally to this work.

✉ David M. Smadja
david.smadja@aphp.fr

¹ Institut Curie, Cytometry Platform, 75006 Paris, France

² Innovative Therapies in Haemostasis, INSERM, Université de Paris, 75006 Paris, France

³ Vascular Medicine Department and Georges Pompidou European Hospital, AP-HP, 75015 Paris, France

⁴ Hematology and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, 75015 Paris, France

⁵ Carmat SA, Vélizy-Villacoublay, France

⁶ Department of Cardiovascular Surgery, Institute for Clinical and Experimental Medicine, Prague, Czech Republic

⁷ Cardiac Surgery Department and Biosurgical Research Lab (Carpentier Foundation), AP-HP, Georges Pompidou European Hospital, Université de Paris, 75015 Paris, France

⁸ PARCC, INSERM, Université de Paris, 75015 Paris, France

all components embodied in a single device, implanted in the pericardial sac [2]. The surfaces in contact with the patient's blood are formed from expanded polytetrafluorethylene and bovine pericardial tissue membrane processed in glutaraldehyde [3]. These types of material have demonstrated a high level of biocompatibility in various applications such as bio-prosthetic cardiac valve replacement [4]. A-TAH efficacy has been proven in a feasibility study and then in a pivotal study, mainly in the indication of bridge-to-transplantation, leading to recent CE market approval [5, 6].

We previously described, in the first three implanted patients, the histological characteristics of explanted devices [7]. In electron microscopy, we found a homogeneous adherent fibrin cellular network with endothelial cell deposition on this fibrin cap [7]. The endothelial phenotype was confirmed with vascular endothelial (VE)-cadherin expression and the presence of tight junctional structures observed by electron microscopy [7]. The origin of these endothelial cells remains unknown. Indeed, these cells shall originate from the circulating blood, since there is no physical connection between the endothelialized hybrid membrane and the patient's blood vessels. This could be linked to circulating endothelial progenitor cells (EPCs) or very small embryonic-like stem cells (VSELs) [1]. EPCs and, in particular, endothelial colony-forming cells (ECFCs) obtained in culture are vasculogenic cells in adult humans [8, 9]. However, the phenotype of circulating EPCs is classically described as a subpopulation of circulating CD34⁺ and/or CD133⁺ stem cells expressing mainly VEGFR-2 receptor (KDR in human) [10]. A multidimensional proteomic approach of circulating cells allowed us to fully characterize stem and progenitor cells in peripheral blood that could be at the origin of the endothelial cells. This extensive phenotyping enabled us to demonstrate that non-KDR cells with immaturity markers can be mobilized and confirmed the absence of KDR on circulating stem/progenitor cells [11]. These mobilized progenitor cells could come from VSELs. These latter's are defined in human as lineage-negative (Lin⁻), CD133⁺ and/or CD34⁺ and CD45⁻ cells of small size [12–14]. VSELs are able to give rise to endothelial cells and promote post-ischemic revascularization [15, 16].

The aim of the present study was to identify the distribution and phenotype of potential circulating vasculogenic stem cells in four patients after long-term A-TAH implantation.

Materials and Methods

Aeson® Bioprosthetic Total Artificial Heart (A-TAH) Study Design and Population

The four patients presented in this study were derived from an ongoing single-arm prospective non-blinded and

non-randomized study (NCT02962973) [6]. The first patient was a 66-year-old who had the device implanted for 599 days and died. The second one was a 57-year-old who had the device implanted for 304 days before receiving a heart transplant. The third patient was 70 years old and had the device implanted for 271 days and was heart transplanted. The last patient was a 43-year-old who had the device implanted for 308 days before heart transplant. All patients were classified in Interagency Registry for Mechanically Assisted Circulatory Support (INTERMACS) 3 or 4 and clinical characteristics are presented in Table 1.

Sampling

Peripheral blood samples were collected on EDTA respectively before (T0), after one month (T1), between two and five months (T2), and between six and twelve months after A-TAH implantation (T3). Ficoll-isolated peripheral blood mononuclear cells (PB-MNCs) were isolated, aliquoted, frozen, and stored to assess the distribution of stem cells by spectral flow cytometry.

Flow Cytometry

PB-MNCs samples from patients were slowly thawed and resuspended in PBS-FBS-EDTA buffer for counting in first step and resuspended at a concentration of 10 millions of cells per mL. Cells were incubated with an anti-human antibodies cocktail of lineage (α -CD3, α -CD14, α -CD16, α -CD11b, α -CD11c, α -CD19, α -CD56), CD45-BV650 (BioLegend), CD34-PeCy7 (BioLegend), c-Kit (CD117)-PeDazzle594 (BioLegend), CD133-VioBright667 (Miltenyi Biotec) and Zombie NIR (Biolegend) for viability during 30 min in the dark. Cells were washed by adding PBS-SVF-EDTA buffer and centrifuged two times. Before acquisition, cells were fixed during 45 min in the dark at 4 °C. Acquisitions were performed with a three lasers Aurora spectral flow cytometer (Cytex). Unmixing was calculated and applied

Table 1 Pre-Implantation characteristics of patients implanted with A-TAH

Patients	1	2	3	4
Age (years)	66	57	70	43
Gender	Male	Male	Male	Male
BSA (m ²)	2.13	1.89	2.06	2.36
Cardiac index (L/min/m ²)	1.24	1.66	1.60	1.65
INTERMACS class	4	3	3	3
Indication	DT	BTT	DT	BTT
Support duration (days)	599	304	271	308

BSA: body surface area; INTERMACS: Interagency registry for mechanically assisted circulatory support DT: Destination therapy, BTT: bridge-to-transplantation

to samples based on reference single stained PB-MNCs controls. Data were first analyzed in a supervised way with FlowJo (FlowJo, LLC) to identify immature cells. Down sampling of CD34⁺ population was done for every sample. Featured on CD45, CD34, CD133 and c-Kit expressions, consecutive dimension reduction was performed by Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) algorithm [17] and meta-clustering was assessed by FlowSOM enabled identification of 7 clusters among the CD34⁺ cells using the cloud-based platform OMIQ (<https://www.omiq.ai/>).

Statistical Analysis

Continuous data were expressed as mean of cells \pm standard error of the mean. In the univariate analysis, we determined the differences within repeated measures by a non-parametric test. A p-value of 0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed using with GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., San Diego, USA).

Results and Discussion

PB-MNCs from four male patients were collected before A-TAH implantation (T0) and after implantation at one month (T1), between two and five months (T2), and then between six and twelve months (T3). As the A-TAH hybrid membrane has been described as being endothelialized after several months of implantation [7], we decided to explore the phenotype of circulating stem cells after implantation in order to hypothesize the cell origin of these newly formed endothelial tissues. Supervised analysis of flow cytometry data confirmed the presence of the previously identified Lin⁻CD133⁺CD45⁻ and Lin⁻CD34⁺ with different CD45 level intensities. Lin⁻CD133⁺CD45⁻ and Lin⁻CD34⁺CD45⁻ were assumed to contain VSELs and were not modulated during the period studied here. The statistical analysis showed that, among the three populations of CD34⁺ only the Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} was significantly increased one month after A-TAH implantation in contrast to pre-implantation level ($p=0.01$, Table 2), regardless of the expression of CD133 or c-Kit. Indeed, Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} population could be sub-divided into four categories according to the positivity of CD133 and c-Kit. When CD133 or c-Kit were positive, we always observed a significant increase in stem cells after implantation, whereas there was no significant difference after A-TAH implantation in the Lin⁻CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻c-Kit⁻ population. The data for the resulting clusters are visualized on a UMAP plot in Fig. 1 showing all single cells of the live Lin⁻ and CD34⁺ events selected from down sampled files concatenated at T0 and T1. The algorithm proposed seven clusters.

As demonstrated in Fig. 1A, three of the seven clusters evidenced were upregulated in T1, in contrast to T0: clusters 7, 4, and 2. In Fig. 1B, analysis demonstrated that the increase concerned the three CD45^{dim} clusters, confirming our results presented in Table 2. Thus, using a flow cytometry approach, we showed a significant mobilization of Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} in peripheral blood one month after A-TAH implantation. We recently described a progressive endothelialization of the bioprosthetic hybrid membrane of the A-TAH that could be at the origin of its acquired hemocompatibility [7]. As there is no physical connection between the internal membrane of the device and the patient's blood vessels, the source of these neo-endocardial cells in the A-TAH shall come from the circulating blood. Thus, the aim of this study was to identify by conventional flow cytometry approaches stem cells in blood that could be mobilized and could give rise to newly formed endothelial cells on the hybrid membrane of the A-TAH.

In the past years, CD34⁺ cells emerged as the most convincing cell type among those that have been evaluated for their use in cell-therapy trials and as biomarker of cardiac disease [10]. CD34⁺ hematopoietic stem cells with the CD45^{dim} phenotype have been proposed as a source of extra hematopoietic cells like cardiomyocytes for example [18], although this has been controversial [19]. However, in human adults, we don't know with certitude the stem cell at the origin of ECFCs. Indeed, it is now admitted that ECFCs are the main human post-natal vasculogenic cells [8]. ECFCs have been described to grow from circulating CD34⁺ cells present in adult peripheral blood, but during in vitro expansion part of the cells lose CD34. CD34⁺ and CD34⁻ ECFCs have different angiogenic properties and CD34 expression in ECFCs could be related to a specific state of endothelial phenotype [20]. Their origin has been proposed in CD45 negative cells [21] but subtype of CD34 involved in ECFC differentiation is unclear [22]. CD34⁺ cell sub-populations may be derived from VSELs. VSELs were first identified as CD45 negative cells and characterized by their very small size (3–5 μm in diameter) in murine and human bone marrow (5–6 μm in diameter) [14]. VSELs are mobilized into peripheral blood in response to injury following acute myocardial infarction [23] or critical leg ischemia [15] and we previously demonstrated that these cells trigger post-ischemic revascularization [15]. Others and we have also shown VSELs ability to differentiate into endothelial cells [15, 24–26]. Human VSELs have been described expressing CD133, but some description of human CD34⁺VSELs have been done and their vascular differentiation ability confirmed [27]. CD34⁺VSELs can regenerate damaged organs and may solve the problems inherent in the use of controversial embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells indeed. In our study, we did not include any size beads. However, when back gating our populations, we

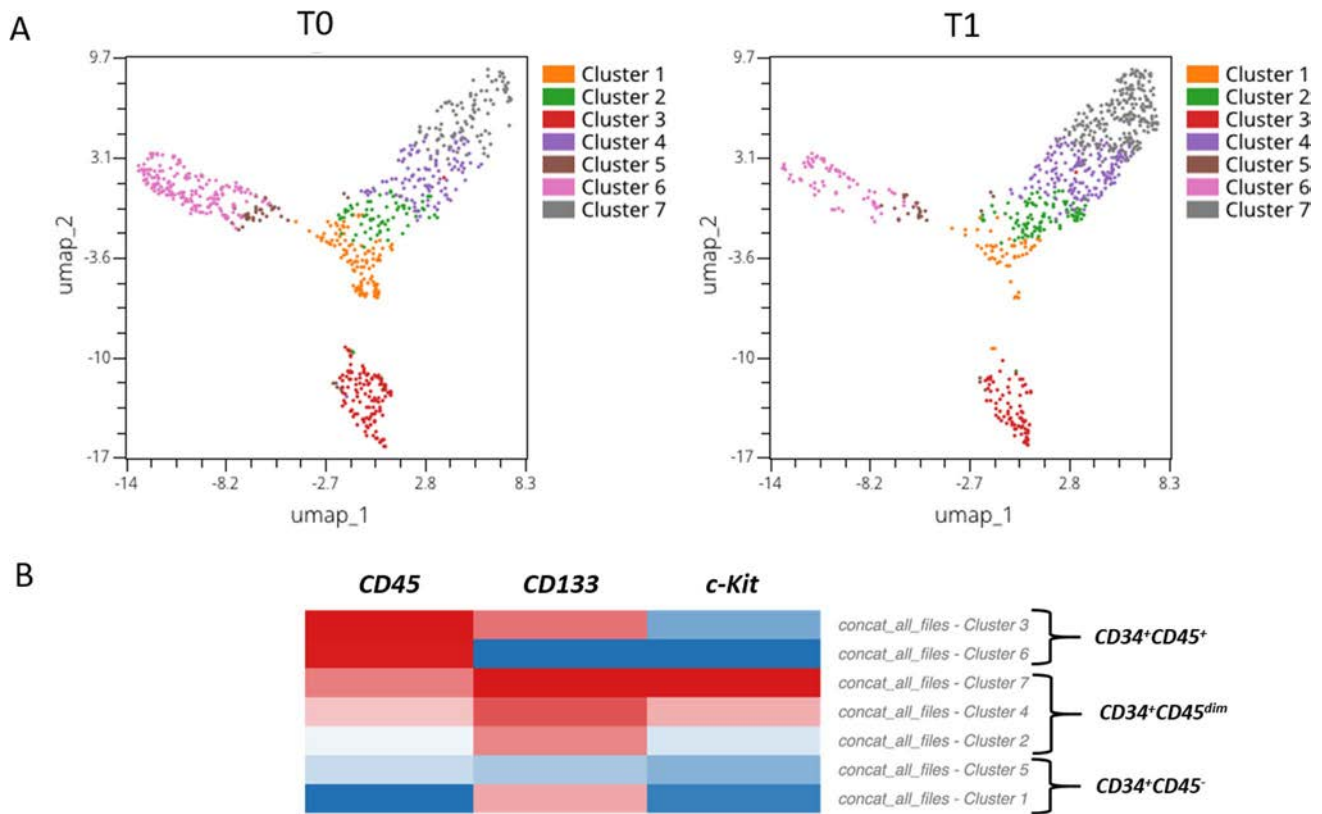


Fig. 1 **A** Patients concatenated CD34⁺ cells meta-clustering with UMAP visualization per condition, i.e. T0 before A-TAH implantation and T1 one month after implantation. **B** Heatmap of CD45, CD133 and c-Kit⁺ relative expression levels per cluster of CD34⁺ patients and time points concatenated

Table 2 Stem cell counts per million live CD45⁺ cells; the results are shown as mean of cells ± standard error of the mean (in bold: significant p-value with p<0.05)

Population (cells per million live CD45 ⁺)	T0	T1	T2	T3	p-value
1- Lin ⁻ CD133 ⁺ CD45 ⁻	2364 ± 2151	754 ± 501	768 ± 273	343 ± 90	0.87
2- Lin ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁻	244 ± 77	84 ± 54	244 ± 98	250 ± 53	0.20
Lin ⁻ CD45 ⁻ CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁺	0	0	0	0	
Lin ⁻ CD45 ⁻ CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁺	0	0	0	0	
Lin ⁻ CD45 ⁻ CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁻	0	0	4 ± 4	0	0.53
Lin ⁻ CD45 ⁻ CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁻	244 ± 77	84 ± 54	240 ± 98	250 ± 53	0.17
3- Lin ⁻ CD34 ⁺ CD45 ^{dim}	1015 ± 341	3515 ± 1772	940 ± 359	321 ± 125	0.01
Lin ⁻ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁺	219 ± 77	562 ± 184	164 ± 47	56 ± 21	0.02
Lin ⁻ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁺	250 ± 122	1783 ± 1302	375 ± 210	41 ± 26	0.01
Lin ⁻ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁻	112 ± 38	430 ± 177	81 ± 22	20 ± 12	0.006
Lin ⁻ CD45 ^{dim} CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁻	433 ± 154	741 ± 143	320 ± 92	203 ± 104	0.08
4- Lin ⁻ CD34 ⁺ CD45 ⁺	728 ± 375	502 ± 213	724 ± 303	1600 ± 1108	0.98
Lin ⁻ CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁺	39 ± 20	20 ± 7	22 ± 9	20 ± 6	0.71
Lin ⁻ CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁺	3 ± 3	4 ± 2	2 ± 1	2 ± 1	0.85
Lin ⁻ CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁺ c-Kit ⁻	20 ± 13	15 ± 9	32 ± 16	28 ± 11	0.84
Lin ⁻ CD45 ⁺ CD34 ⁺ CD133 ⁻ c-Kit ⁻	665 ± 346	462 ± 209	667 ± 283	1550 ± 1098	0.98

can assume that Lin⁻CD133⁺CD45⁻ cells are only small sized cells compatible with VSELs phenotype. In contrast, Lin⁻CD34⁺CD45⁻ and Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} are a mix of small and large sized CD34⁺ cells. Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} of small size has never been specifically studied in terms of multipotent differentiation ability. Thus, we observed the mobilization of a CD34⁺ population with CD45^{dim} expression while the CD45^{neg} population was not mobilized. This CD45^{dim} population contained various-sized cells. Further study needs to evaluate the ability of CD45^{dim}CD34⁺ cells of small and “normal size” to give rise to endothelial cells in vitro and in vivo and validate the origin of newly formed endothelial cells on top of A-TAH hybrid membrane.

All in all, bioprosthetic A-TAH implantation allowed us to evidence the mobilization in peripheral blood of Lin⁻CD34⁺CD45^{dim} stem cells that could be at the origin of the endothelial recovery. In order to organize new cell-therapy trials or determine the cells at the origin of endothelial lineage in vivo further studies need to appreciate the size of stem cells that are mobilized and able to build vessels. This topic of adult stem cells at the top of the hierarchy of endothelial lineage requires research on stem cells in peripheral blood in other cardiovascular mobilization situations, especially organ replacement requiring cell recolonization. New multidimensional proteomic approach by flow, imaging, or mass cytometry associated with bioinformatic analysis may help to improve the screening of stem cells involved in the vasculogenic process.

Acknowledgements We would like to acknowledge all nurses, technicians and physicians involved in the cardiac Surgery department involved in A-TAH implantation. The central illustration figure was created with BioRender.com

Author Contribution LG, CG and GD analyzed the data and wrote the paper. NG, AP, LS, CP, TM performed and/or analyzed the data. CL, PI, ACarpentier and IN included patients and reviewed the paper. ACapel and PJ organized clinical trials. A Carpentier is inventor of C-TAH and reviewed the paper. DMS supervised the work, analyzed the data and wrote the paper.

Funding This work was supported by grants of CARMAT and PROMEX STIFTUNG FUR DIE FORSCHUNG foundation.

Data Availability All data are available upon request.

Declarations

Ethical Approval Samples from the four patients in the C-TAH CE Mark clinical trial (Identifier: NCT02962973).

Consent to Participate All patients signed informed consent to participate to research and authorized their data publication.

Consent to Publish All co-authors agree to publish these data.

Competing Interests A Carpentier is cofounder and shareholder of CARMAT SA. DM Smadja received consulting fees from CARMAT. C Latremouille, A Capel and P. Jansen are employed by CARMAT-SAS.

References

- Han, J. J. (2021). Aeson-The Carmat total artificial heart is approved for enrollment in the United States. *Artificial Organs*, 45(5), 445–446.
- Carpentier, A., Latremouille, C., Cholley, B., Smadja, D. M., Roussel, J. C., Boissier, E., et al. (2015). First clinical use of a bioprosthetic total artificial heart: Report of two cases. *Lancet*, 386(10003), 1556–1563.
- Richez, U., De Castilla, H., Guerin, C. L., Gendron, N., Luraghi, G., Grimme, M., et al. (2019). Hemocompatibility and safety of the Carmat Total Artificial Heart hybrid membrane. *Heliyon*, 5(12), e02914.
- Carpentier, A. (2007). Lasker Clinical Research Award. The surprising rise of nonthrombogenic valvular surgery. *Nature Medicine*, 13(10), 1165–8.
- Latremouille, C., Carpentier, A., Leprince, P., Roussel, J. C., Cholley, B., Boissier, E., et al. (2018). A bioprosthetic total artificial heart for end-stage heart failure: Results from a pilot study. *Journal of Heart and Lung Transplantation*, 37(1), 33–37.
- Netuka, I., Pya, Y., Bekbossynova, M., Ivak, P., Konarik, M., Gustafsson, F., et al. (2020). Initial bridge to transplant experience with a bioprosthetic autoregulated artificial heart. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*
- Smadja, D. M., Saubamea, B., Susen, S., Kindo, M., Bruneval, P., Van Belle, E., et al. (2017). Bioprosthetic Total Artificial Heart Induces a Profile of Acquired Hemocompatibility With Membranes Recellularization. *Journal of the American College of Cardiology*, 70(3), 404–406.
- Smadja, D. M., Melero-Martin, J. M., Eikenboom, J., Bowman, M., Sabatier, F., & Randi, A. M. (2019). Standardization of methods to quantify and culture endothelial colony-forming cells derived from peripheral blood: Position paper from the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 17(7), 1190–1194.
- Yoder, M. C., Mead, L. E., Prater, D., Krier, T. R., Mroueh, K. N., Li, F., et al. (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*, 109(5), 1801–1809.
- Rigato, M., Avogaro, A., & Fadini, G. P. (2016). Levels of Circulating Progenitor Cells, Cardiovascular Outcomes and Death: A Meta-Analysis of Prospective Observational Studies. *Circulation Research*, 118(12), 1930–1939.
- Guerin, C. L., Guyonnet, L., Goudot, G., Revets, D., Konstantinou, M., Chipont, A., et al. (2020). Multidimensional Proteomic Approach of Endothelial Progenitors Demonstrate Expression of KDR Restricted to CD19 Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*. In press
- Henon, P. (2020). Key Success Factors for Regenerative Medicine in Acquired Heart Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports*, 16(3), 441–458.
- Lahlil, R., Scrofani, M., Barbet, R., Tancredi, C., Aries, A., & Henon, P. (2018). VSELs Maintain their Pluripotency and Competence to Differentiate after Enhanced Ex Vivo Expansion. *Stem Cell Reviews and Reports*, 14(4), 510–524.
- Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J., & Kucia, M. (2019). Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circulation Research*, 124(2), 208–210.

15. Guerin, C. L., Loyer, X., Vilar, J., Cras, A., Mirault, T., Gaussem, P., et al. (2015). Bone-marrow-derived very small embryonic-like stem cells in patients with critical leg ischaemia: Evidence of vasculogenic potential. *Thrombosis and Haemostasis*, *113*(5), 1084–1094.
16. Guerin, C. L., Rossi, E., Saubamea, B., Cras, A., Mignon, V., Silvestre, J. S., et al. (2017). Human very Small Embryonic-like Cells Support Vascular Maturation and Therapeutic Revascularization Induced by Endothelial Progenitor Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *13*(4), 552–560.
17. Becht, E., McInnes, L., Healy, J., Dutertre, C. A., Kwok, I. W. H., Ng, L. G., et al. (2019). Dimensionality reduction for visualizing single-cell data using UMAP. *Nature Biotechnology*
18. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., et al. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, *410*(6829), 701–705.
19. Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke, H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., et al. (2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. *Nature*, *428*(6983), 664–668.
20. Tasev, D., Konijnenberg, L. S., Amado-Azevedo, J., van Wijhe, M. H., Koolwijk, P., & van Hinsbergh, V. W. (2016). CD34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ECFCs). *Angiogenesis*, *19*(3), 325–338.
21. Timmermans, F., Van Hauwermeiren, F., De Smedt, M., Raedt, R., Plasschaert, F., De Buyzere, M. L., et al. (2007). Endothelial outgrowth cells are not derived from CD133+ cells or CD45+ hematopoietic precursors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(7), 1572–1579.
22. Case, J., Mead, L. E., Bessler, W. K., Prater, D., White, H. A., Saadatzadeh, M. R., et al. (2007). Human CD34+AC133+VEGFR-2+ cells are not endothelial progenitor cells but distinct, primitive hematopoietic progenitors. *Experimental Hematology*, *35*(7), 1109–1118.
23. Abdel-Latif, A., Zuba-Surma, E. K., Ziada, K. M., Kucia, M., Cohen, D. A., Kaplan, A. M., et al. (2010). Evidence of mobilization of pluripotent stem cells into peripheral blood of patients with myocardial ischemia. *Experimental Hematology*, *38*(12), 1131–42 e1.
24. Havens, A. M., Sun, H., Shiozawa, Y., Jung, Y., Wang, J., Mishra, A., et al. (2014). Human and murine very small embryonic-like cells represent multipotent tissue progenitors, in vitro and in vivo. *Stem Cells and Development*, *23*(7), 689–701.
25. Wu, J. H., Wang, H. J., Tan, Y. Z., & Li, Z. H. (2012). Characterization of rat very small embryonic-like stem cells and cardiac repair after cell transplantation for myocardial infarction. *Stem Cells and Development*, *21*(8), 1367–1379.
26. Zhang, S., Zhao, L., Wang, J., Chen, N., Yan, J., & Pan, X. (2017). HIF-2alpha and Oct4 have synergistic effects on survival and myocardial repair of very small embryonic-like mesenchymal stem cells in infarcted hearts. *Cell Death & Disease*, *8*(1), e2548.
27. Lahlil, R., Scrofani, M., Barbet, R., Tancredi, C., Aries, A., & Henon, P. (2018). VSELs Maintain their Pluripotency and Competence to Differentiate after Enhanced Ex Vivo Expansion. *Stem Cell Reviews*, *14*(4), 510–524.

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.