

UNIVERSITÉ DE LILLE

École Doctorale Biologie Santé de Lille

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Section CNU 47 : Cancérologie, Génétique, Hématologie, Immunologie

**IMPACT DE L'INFLAMMATION SUR LES COMPLICATIONS POST-
PROCÉDURALES DU TAVI : RÔLE DES MONOCYTES ET DE L'HÉMATOPOÏÈSE
CLONALE DE SIGNIFICATION INDÉTERMINÉE**

Thèse soutenue publiquement le 20 décembre 2022 par

Fanny LASSALLE

JURY

Madame le Professeur Sophie SUSEN

Présidente du Jury

Madame le Professeur Chloé JAMES

Rapporteur

Madame le Professeur Cécile OURY

Rapporteur

Monsieur le Docteur Thibault LHERMUSIER

Examineur

Monsieur le Docteur Flavien VINCENT

Examineur

Madame le Professeur Annabelle DUPONT

Directrice de thèse

Remerciements

J'adresse tout d'abord mes sincères et respectueux remerciements aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Je remercie le Professeur Sophie Susen pour m'avoir donné l'opportunité de réaliser cette thèse au sein de son équipe et m'avoir accordé sa confiance.

Je remercie le Professeur Chloé James et le Professeur Cécile Oury de me faire l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie le Docteur Flavien Vincent et le Docteur Thibault Lhermusier d'avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Annabelle Dupont pour son encadrement de qualité durant ces 4 années de thèse, sa bienveillance et sa disponibilité. Sois assurée de ma profonde reconnaissance.

Je remercie vivement le Docteur Nicolas Duployez pour son aide précieuse, sans qui une partie de ce travail n'aurait pu se réaliser.

Je remercie également Mickaël Rosa, Olivier Molendi-Coste, Céline Gheeraert et les techniciens de cytométrie en flux du laboratoire d'hématologie du CHU de Lille pour leur collaboration à la réalisation de ces travaux.

Merci à mes collègues biologistes Anne, Emmanuelle, Christophe, Antoine et Maximilien pour ces belles années passées au sein du laboratoire d'hémostase du CHU de Lille, à Bertrand pour son enthousiasme permanent au développement de la biologie moléculaire, et à tous les techniciens et techniciennes du laboratoire. J'ai été heureuse de travailler à vos côtés.

A mes parents et à mon frère pour leur soutien indéfectible depuis toutes ces années.

A mes amis pour leur présence et pour tous ces bons moments passés ensemble.

A Sébastien, pour tout ce qu'il m'apporte chaque jour, à cette page qui se tourne et à toutes celles que nous allons écrire ensemble.

Publications et communications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications et communications suivantes :

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

Lassalle F, Rosa M, Staels B, Van Belle E, Susen S, Dupont A. Circulating monocyte subsets and transcatheter aortic valve replacement. *Int J Mol Sci.* 2022; 23(10), 5303.

Lassalle F, Duployez N, Vincent F, Rauch A, Denimal T, Rosa M, Staels B, Preudhomme C, Susen S, Van Belle E, Dupont A. Overwhelming negative impact of *TET2* mutations on long-term survival after transcatheter aortic valve replacement. Article soumis.

Communications orales en congrès national

Lassalle F, Vincent F, Rosa M, Rauch A, Dumezy F, Roumier C, Dombrowicz D, Gheeraert C, Lefebvre P, Staels B, Vincentelli A, Van Belle E, Susen S, Dupont A. Modulation du phénotype hémostatique et inflammatoire des monocytes après TAVI et impact sur les complications post-procédurales. Congrès Français de l'Hémostase (CFH), 2 juin 2022, Bordeaux, France

Lassalle F, Duployez N, Vincent F, Rauch A, Rosa M, Staels B, Preudhomme C, Susen S, Van Belle E, Dupont A. Hématopoïèse clonale de signification indéterminée et sténose valvulaire aortique, prévalence élevée et large spectre de mutations. Congrès Français de l'Hémostase (CFH), 2 juin 2022, Bordeaux, France

Autres publications en lien avec le travail de thèse, dans des revues internationales à comité de lecture :

Van Belle E, Debry N, Vincent F, Kuchcinski G, Cordonnier C, Rauch A, Robin E, **Lassalle F**, Pontana F, Delhay C, Schurtz G, Jeanpierre E, Rousse N, Casari C, Spillemaecker H, Porouchani S, Pamart T, Denimal T, Neiger X, Verdier B, Puy L, Cosenza A, Juthier F, Richardson M, Bretzner M, Dallongeville J, Labreuche J, Mazighi M, Dupont A, Staels B, Lenting P, Susen S. Cerebral microbeels durint transcatheter aortic valve replacement: a prospective magnetic resonance imaging cohort. *Circulation* 2022; 146:383-397

Dupont A, Rauch A, Staessens S, Moussa M, Rosa M, Corseaux D, Jeanpierre E, Goutay J, Caplan M, Varlet P, Lefevre G, **Lassalle F**, Bauters A, Faure K, Lambert M, Duhamel A, Labreuche J, Garrigue D, De Meyer S, Staels B, Vincent F, Rousse N, Kipnis E, Lenting P, Poissy J, Susen S. Vascular endothelial damage in the pathogenesis of organ injury in severe COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2021; 41:1760–1773

Rauch A, Dupont A, Goutay J, Caplan M, Staessens S, Moussa M, Jeanpierre E, Corseaux D, Lefevre G, **Lassalle F**, Faure K, Lambert M, Duhamel A, Labreuche J, Garrigue D, De Meyer S, Staels B, Van Belle E, Vincent F, Kipnis E, Lenting P, Poissy P, Susen L, Lille Covid Research Network (LICORNE). Endotheliopathy is induced by plasma from critically-ill patients and associated with organ failure in severe COVID-19. *Circulation*. 2020; 142:1881-1884

Rauch A, Labreuche J, **Lassalle F**, Goutay J, Caplan M, Charbonnier L, Rohn A, Jeanpierre E, Dupont A, Duhamel A, Faure K, Lambert M, Kipnis E, Garrigue D, Lenting PJ, Poissy J, Susen S. Coagulation markers are independent predictors of increased oxygen requirements in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020; 18:2942–2953

Poissy J, Goutay J, Caplan M, Parmentier E, Duburcq T, **Lassalle F**, Jeanpierre E, Rauch A, Labreuche J, Susen S, and the Lille ICU Haemostasis COVID-19 group. Pulmonary embolism in COVID-19 patients: awareness of an increased prevalence. *Circulation*. 2020; 142:184–186

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABBRÉVIATIONS	6
INTRODUCTION GÉNÉRALE	9
LA STÉNOSE VALVULAIRE AORTIQUE.....	11
1. Physiopathologie de la sténose valvulaire aortique	11
2. Conséquences hémodynamiques de la sténose valvulaire aortique.....	15
3. Le TAVI.....	16
4. Marqueurs prédictifs des complications post-TAVI	20
LES MONOCYTES.....	25
1. Origine	25
2. Fonctions physiologiques	25
3. Hétérogénéité des monocytes humains	28
4. Evolution des sous-populations en fonction des situations physiopathologiques.....	31
5. Traitement préventif de l'inflammation lors du TAVI	39
L'HÉMATOPOÏÈSE CLONALE DE SIGNIFICATION INDÉTERMINÉE	42
1. Généralités	42
2. CHIP et inflammation	45
3. CHIP et maladies cardiovasculaires.....	46
CHAPITRE 1 : Modulation du phénotype hémostatique et inflammatoire des monocytes après TAVI et impact sur les complications post-procédurales	48
CHAPITRE 2 : Hématopoïèse clonale de signification indéterminée et sténose valvulaire aortique : prévalence élevée, large spectre de mutations et mauvais pronostic des variants <i>TET2</i> sur la mortalité à long terme après TAVI	67
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	89
BIBLIOGRAPHIE.....	92
ANNEXES	108

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

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

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AVC : accident vasculaire cérébral

CCL : C-C motif chemokine ligand

CD : cluster de différenciation

CHIP : hématopoïèse clonale de signification indéterminée

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

IC : intervalle de confiance

CRP : protéine C réactive

CSH : cellule souche hématopoïétique

DAMPs : damage-associated molecular patterns

EuroSCORE : European system for cardiac operative risk evaluation

FC : fold change

GDF-15 : growth differentiation factor 15

HAS : Haute Autorité de Santé

HR : hazard ratio

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor

IDM : infarctus du myocarde

IL : interleukine

IMC : indice de masse corporelle

IQR : interquartile

LSM : lymphocyte-sur-monocyte

MCP-1 : monocyte chemoattractant protein 1

NETs : neutrophil extracellular traps

NF : nuclear factor

NFS : numération formule sanguine

NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NSL : neutrophile-sur-lymphocyte

NT-proBNP : N-terminal pro-brain natriuretic peptide

NYHA : New York Heart Association

PAMPs : pathogen-associated molecular patterns

PSL : plaquette-sur-lymphocyte

RIN : RNA Integrity Number

ROS : espèces réactives de l'oxygène

SVA : sténose valvulaire aortique

ST2 : suppression of tumorigenicity

STS : society of thoracic surgeons

TAFI : thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor

TAVI : implantation de valve aortique par voie percutanée

TLR : toll-like receptor

TNF- α : tumor necrosis factor α

TGF- β 1 : transforming growth factor β 1

VAF : fréquence allélique du variant

VEGF : vascular endothelial growth factor

VWF : facteur von Willebrand

VWF:Ag : antigène du facteur von Willebrand

VWF:CB : activité de liaison au collagène du facteur von Willebrand

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la pathologie valvulaire la plus fréquente chez le sujet âgé et est associée, dès l'apparition des premiers signes cliniques, à une morbidité et une mortalité importante en l'absence de prise en charge [1]. Cette pathologie inflammatoire chronique se caractérise par une infiltration importante de macrophages dérivés des monocytes sanguins dans le tissu valvulaire aortique [2], entraînant une fibrose et une calcification des feuillets valvulaires dont les conséquences sont un rétrécissement de l'ouverture de la valve aortique avec d'importantes forces de cisaillement, une diminution de la pulsatilité artérielle et une augmentation de la rigidité valvulaire [3–6].

À ce jour, le remplacement de la valve aortique par voie chirurgicale ou percutanée est l'unique option thérapeutique pour les patients atteints d'une SVA sévère [7]. En une vingtaine d'années, l'implantation d'une valve aortique par voie percutanée (TAVI, *transcatheter aortic valve implantation*) s'est rapidement imposée comme la procédure de référence pour les patients à haut risque chirurgical, et les recommandations récentes proposent même d'étendre les indications aux patients à risque faible et intermédiaire [8,9]. Cependant, le TAVI reste associé à la survenue de complications hémorragiques et thrombotiques fréquentes, impactant la morbi-mortalité des patients à court, moyen et long terme [10]. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de ces complications restent encore incompris, et même si quelques biomarqueurs ont été proposés pour prédire le pronostic des patients après TAVI, ils restent limités et des études sont encore nécessaires [11]. De plus, par la restauration immédiate du flux sanguin et la réduction instantanée des forces de cisaillement lors du déploiement de la bioprothèse valvulaire, le TAVI représente un modèle

unique d'étude de l'impact de la pulsatilité du flux sanguin sur les cellules circulantes, en particulier les monocytes, qui jouent un rôle essentiel dans l'inflammation et les processus de l'hémostase et liant immunité innée et adaptative.

La vision historique de la biologie des monocytes a été révisée récemment, prenant en compte leur hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle ainsi que leur sensibilité aux changements de leur environnement [12,13]. Des études récentes ont de plus établi des associations entre les 3 sous-populations monocytaires sanguines classiquement décrites aujourd'hui et les maladies cardiovasculaires avec une valeur pronostique de la répartition de ces sous-populations [14,15].

Enfin, des travaux récents ont montré que l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP) pouvait être considérée comme un nouveau facteur de risque lié à l'âge des maladies cardiovasculaires [16,17] et que les principaux gènes mutés en CHIP, *DNMT3A* et *TET2*, auraient un rôle dans la régulation du phénotype inflammatoire des monocytes [18]. Cependant, le rôle de la CHIP a été encore très peu étudié dans des populations de patients atteints de SVA et bénéficiant du TAVI.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier le profil inflammatoire et la modulation du phénotype des monocytes circulants lors de la procédure TAVI, dans le but de mieux comprendre les mécanismes des complications post-procédurales (hémorragies, thromboses, décès). Dans une première partie, nous avons observé l'évolution des concentrations circulantes des différentes sous-populations monocytaires et celle du transcriptome des monocytes avant et après TAVI dans une cohorte de patients avec SVA sévère. Dans une deuxième partie, nous avons établi le profil complet de CHIP avant TAVI et évalué l'association de la CHIP avec la mortalité à long terme après TAVI.

LA STÉNOSE VALVULAIRE AORTIQUE

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la pathologie valvulaire la plus fréquente chez le sujet âgé avec une prévalence estimée entre 2 et 7% chez les sujets de plus de 65 ans [19,20]. Avec le vieillissement des populations, cette prévalence augmentera inévitablement dans les prochaines décennies.

1. Physiopathologie de la sténose valvulaire aortique

1.1. Physiologie de la valve aortique

La valve aortique est localisée à la jonction entre le ventricule gauche et l'aorte et assure le flux unidirectionnel du sang du cœur vers l'aorte. Elle est composée de 3 fines valvules (ou cuspides), ayant chacune la même histologie, composée de 3 couches de matrice extracellulaire qui confèrent à la valve ses propriétés biomécaniques (figure 1) :

- la *fibrosa*, du côté de l'aorte, couche la plus volumineuse, riche en fibrilles de collagène de type I. Elle donne à la valve sa résistance mécanique et permet le maintien de l'intégrité tissulaire,
- la *spongiosa*, riche en glycosaminoglycanes,
- la *ventricularis*, au contact de la cavité ventriculaire, riche en fibres d'élastine [21].

Ce tissu avasculaire est principalement composé de cellules interstitielles de valve, qui maintiennent l'intégrité structurale de la valve [22]. Les cellules endothéliales valvulaires

bordent la *fibrosa* et la *ventricularis* et maintiennent l'homéostasie entre le sang circulant et le tissu valvulaire.

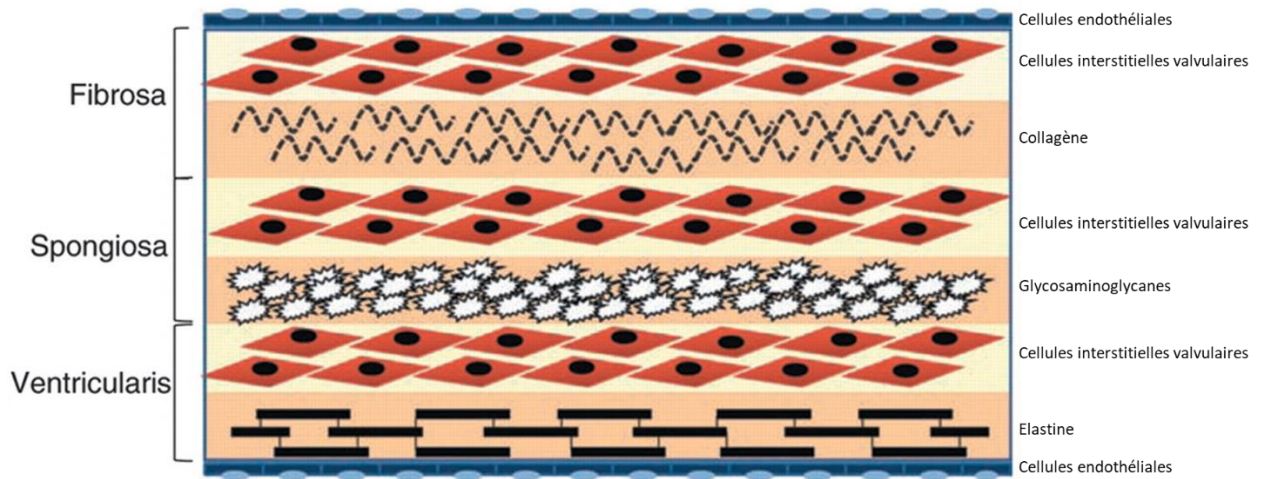


Figure 1 : Architecture cellulaire de la valve aortique humaine (adaptée de Leopold *et al.*, *Circ Cardiovasc Interv* 2012 [23])

1.2. Calcification valvulaire

La SVA est définie par un rétrécissement de la valve aortique, provoqué par un épaissement des 3 feuillets valvulaires qui restreint sa capacité à s'ouvrir normalement. Elle démarre par une phase asymptomatique de sclérose aortique, caractérisée par un épaissement modéré de la valve aortique, une infiltration de cellules sanguines inflammatoires comme les monocytes et des dépôts de calcium, mais sans obstruction significative du flux sanguin. La prévalence de la sclérose aortique est estimée à 20-30% des individus de plus de 65 ans et jusqu'à 50% des individus âgés de 85 ans et plus dans les pays développés [20,24]. L'évolution

de la sclérose aortique vers la SVA est lente et concerne environ 1,9% des patients atteints de sclérose aortique par an.

La SVA a longtemps été considérée comme un processus dégénératif passif lié à l'âge, causé par des dépôts de calcium dans la valve. De récentes études ont remis en cause cette théorie et ont montré que la calcification valvulaire était en fait un processus inflammatoire actif, initié par une lésion endothéliale induite par les forces de cisaillement élevées du sang à travers la valve, entraînant l'infiltration de monocytes dans le tissu valvulaire aortique [2], où ils se différencient en macrophages. Les macrophages recrutés participent à l'oxydation des lipides et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines et des facteurs de croissance, comme le *tumor necrosis factor* α (TNF- α), l'interleukine (IL)-1 β , l'IL-6, le *transforming growth factor* β 1 (TGF- β 1), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et des métalloprotéinases matricielles, entraînant un remodelage de la matrice et une néovascularisation [1,5,25]. De plus, à travers la sécrétion de TGF- β 1 et d'autres cytokines pro-inflammatoires et la libération des microvésicules extracellulaires, les macrophages favorisent la différenciation des cellules interstitielles de valve en phénotype ostéoblastique entraînant la minéralisation de la matrice extracellulaire et la formation de nodules de calcium [26,27]. À terme, les valvules aortiques se calcifient et la valve est sténosée, obstruant l'éjection du sang depuis le ventricule gauche vers l'aorte, provoquant un reflux et/ou un défaut de fermeture de la valve responsable de la symptomatologie cardiaque (dyspnée, angor, lipothymies, insuffisance cardiaque) (figure 2).

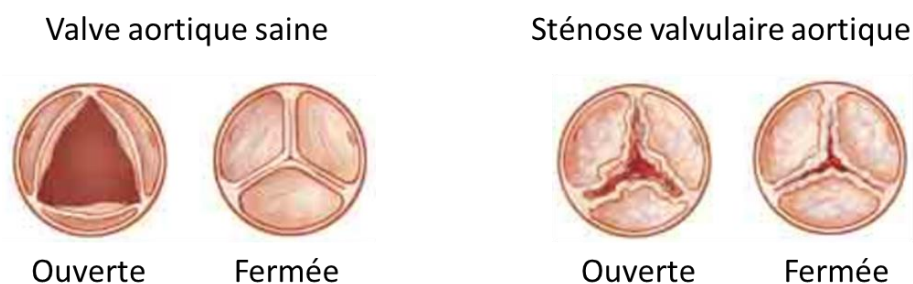


Figure 2 : Représentation schématique d’une valve aortique humaine saine et d’une valve aortique humaine sténosée, en position ouverte et fermée (adaptée de Patel et Kirtane, JAMA Cardiol 2016 [28])

La SVA peut être classée en plusieurs grades de sévérité : légère, modérée et sévère en fonction des paramètres mesurés par échographie couplée au doppler : surface aortique, gradient transvalvulaire moyen et vélocité maximale du jet transvalvulaire [29] (tableau I).

Tableau I : Classification de la sévérité de la sténose valvulaire aortique. Les seuils de classification pour le gradient transvalvulaire moyen sont différents entre les recommandations des Sociétés Européenne et Américaine de cardiologie ^aESC (European Society of Cardiology) et ^bACC/AHA (American College of Cardiology / American Heart Association).

	Légère	Modérée	Sévère
Surface aortique (cm ²)	< 1,5	1 – 1,5	< 1
Gradient transvalvulaire moyen (mmHg)	< 20 ^a < 30 ^b	20 – 40 ^a 30 – 50 ^b	> 40 ^a > 50 ^b
Vélocité maximale du jet transvalvulaire (m/s)	2,6 – 2,9	3 – 4	> 4
Surface aortique indexée (cm ² /m ²)	> 0,85	0,6 – 0,85	< 0,6
Rapport des vélocités	> 0,5	0,25 – 0,5	< 0,25

2. Conséquences hémodynamiques de la sténose valvulaire aortique

2.1. Impact sur le flux

En conditions physiologiques, la valve aortique s'ouvre et se ferme à chaque battement cardiaque, maintenant une vitesse sanguine et un gradient de pression entre le ventricule gauche et l'aorte, avec des forces de cisaillement (ou shear stress) maximales durant le pic systolique [30]. L'ouverture incomplète de la valve lors de la SVA entraîne une obstruction du flux sanguin avec une diminution de la pulsatilité artérielle et une augmentation de la rigidité valvulaire [3–6]. Ce flux sanguin perturbé et turbulent provoque l'augmentation des forces de cisaillement impactant les cellules endothéliales valvulaires, les cellules interstitielles de valve, les cellules sanguines circulantes et les protéines plasmatiques [31–33].

2.2. Impact sur le facteur von Willebrand

Ces perturbations hémodynamiques ont aussi un impact sur le facteur von Willebrand (VWF), entraînant une susceptibilité accrue du VWF au clivage protéolytique par l'ADAMTS13 (*A Disintegrin And Metalloproteinase with a Thrombospondin Type 1 Motif, Member 13*) [34,35]. Le VWF est une glycoprotéine plasmatique multimérique qui joue un rôle essentiel dans l'hémostase primaire en permettant l'adhésion plaquettaire au niveau de la lésion vasculaire suivie de l'agrégation plaquettaire. Il circule dans le plasma dans une conformation globulaire inactive [36], et se déplie sous forme de chaîne étendue sous la contrainte de forces de cisaillement importantes, entraînant le démasquage des sites de liaison plaquettaires qui

induit l'adhésion et l'agrégation plaquettaire. Dans la SVA, les hautes forces de cisaillement fluidiques favorisent le dépliement du VWF et l'exposition prolongée du site de clivage de l'ADAMTS13 [37] et ainsi la protéolyse accrue de la protéine. La perte des multimères de haut poids moléculaire résultant de cette protéolyse par l'ADAMTS13 entraîne le syndrome de Willebrand acquis de type 2A [38] avec de potentielles complications hémorragiques cutanéomuqueuses dues à une angiodyplasie gastro-intestinale, connue sous le nom de syndrome de Heyde [39,40]. Ces conséquences hémorragiques de la SVA se résolvent rapidement suite au remplacement de la valve aortique [41–43].

3. Le TAVI

La SVA sévère symptomatique est associée à une mortalité élevée, jusqu'à 50% à un an en l'absence de traitement [44]. Il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique capable de freiner la progression de la SVA ou d'améliorer la survie des patients. Jusqu'à récemment, le remplacement chirurgical de la valve était la seule option thérapeutique. Cependant, en raison du risque opératoire, il ne peut être proposé à tous les patients [45,46]. Réalisé pour la première fois en 2002 à Rouen, le TAVI a depuis émergé comme une option alternative pour ce groupe de patients à haut risque chirurgical, entraînant une nette réduction de la mortalité peropératoire [44,47]. Le TAVI est une procédure peu invasive qui consiste à implanter par voie artérielle et déployer une bioprothèse valvulaire d'origine bovine ou porcine sertie sur un stent métallique dans la valve sténosée (figure 3). Le choix entre chirurgie et TAVI repose sur le risque de morbi-mortalité peropératoire, l'anatomie aortique et la présence d'une contre-indication ou non à la chirurgie. Toutefois, les recommandations ont évolué et

l'indication du TAVI a été récemment étendue aux patients plus jeunes et à faible risque chirurgical [8,9,48].

L'efficacité et la sécurité du TAVI sont notamment étudiées au travers des études cliniques internationales PARTNER (*Placement of aortic transcatheter valve*, NCT00530894) depuis 2007 [47,49–52].

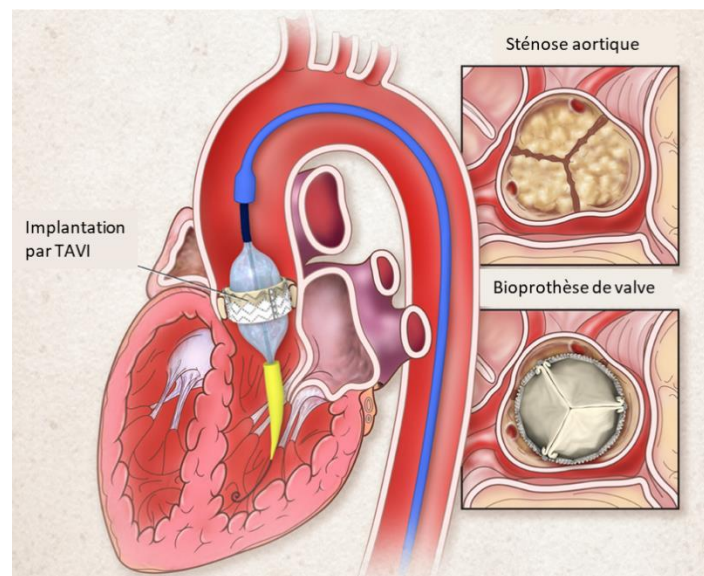


Figure 3 : Implantation de la bioprothèse par voie artérielle lors de la procédure TAVI (adaptée de Smith *et al.*, N Engl J Med 2011 [53])

Le dernier rapport d'évaluation de la Haute Autorité de Santé (HAS) de novembre 2020 fait état de 53 279 TAVI implantés en France entre 2015 et 2019 [54], dont 1409 au Centre Hospitalier Universitaire de Lille, avec une progression de 49% pour ce dernier entre 2015 et 2019 (225 par an en 2015 contre 335 en 2019, parallèlement à une baisse des actes de chirurgie de remplacement de valve, 523 en 2015 contre 381 en 2019). À l'échelle de la France, la voie d'abord transfémorale est prépondérante à 88% et l'âge moyen des patients est de 83 ans.

Lors du déploiement de la bioprothèse, la réouverture de la valve est immédiate avec une restauration instantanée du flux sanguin et une normalisation des forces de cisaillement (figure 4). Le TAVI permet aussi la correction immédiate des anomalies biologiques liées au VWF [38] avec la restauration des multimères de haut poids moléculaire seulement 5 minutes après le déploiement de la nouvelle valve [55].

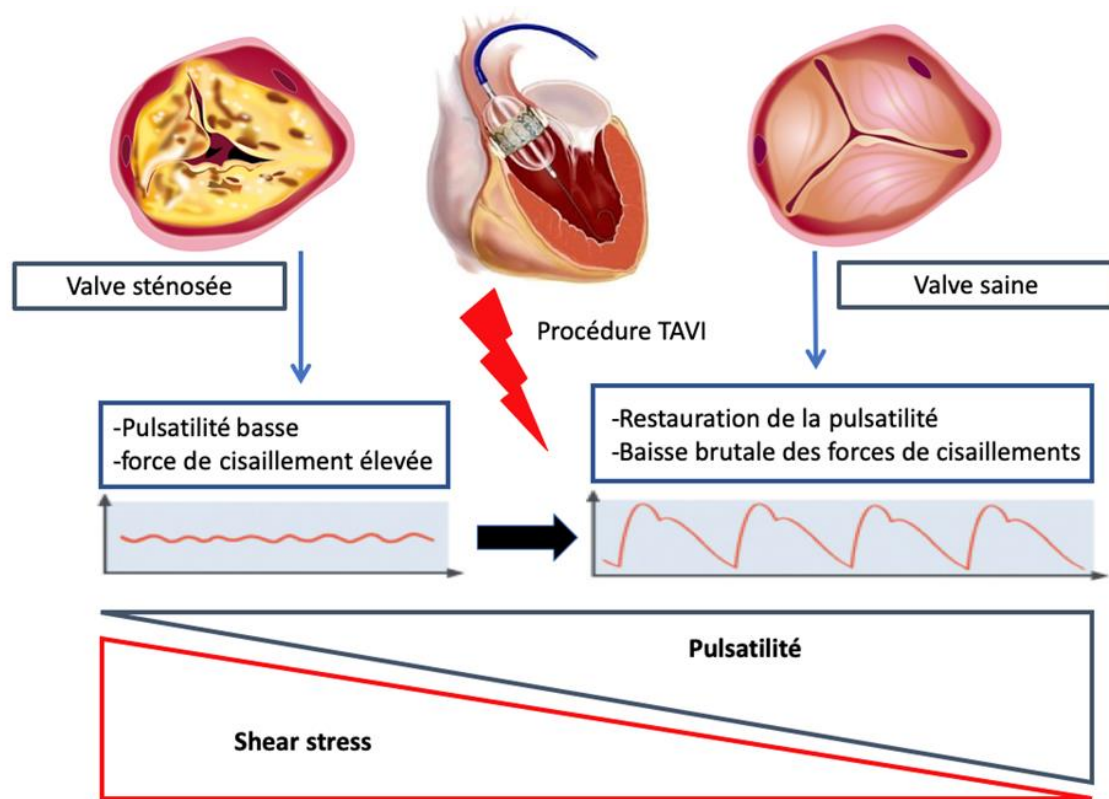


Figure 4 : Impact de la SVA sur la pulsatilité et le shear stress et restauration d'un flux sanguin normal par le TAVI

3.1. Complications post-procédurales

3.1.1. Accident vasculaire cérébral et complications thrombotiques

Malgré une amélioration significative du pronostic du patient et de sa qualité de vie, le TAVI reste associé à des complications post-procédurales hémorragiques et thrombotiques, et la prise en charge de ces patients après TAVI a besoin d'être optimisée. La préoccupation majeure est le risque d'accident vasculaire cérébral (AVC) qui survient dans 3,5% des cas dans les 30 jours après le TAVI (la moitié se produisant dans les premières 24 heures) [56,57] et 7% des cas dans l'année suivant le TAVI [58]. La survenue d'AVC post-procédural est associée à une augmentation de la mortalité à 30 jours et un an [59]. La survenue de ces AVC peut aussi être asymptomatique mais responsable d'un déclin cognitif précoce [49]. Des AVC silencieux ont été détectés par imagerie par résonance magnétique réalisée quelques jours après la procédure chez plus de 3 patients sur 4 [60]. Cette incidence semble plus élevée chez les patients bénéficiant d'un TAVI plutôt que d'une chirurgie de remplacement valvulaire [61]. Au niveau des complications à long terme, une dégénérescence structurale de la valve (déchirure, calcification ou fibrose) est observée dans 5% des cas à 5 ans [62] et des thromboses de prothèse dans 1% des cas à 5 ans [63].

3.1.2. Micro-saignements cérébraux et complications hémorragiques

Le TAVI est aussi associé à des complications hémorragiques. Des saignements majeurs (définis comme causant la mort, une hospitalisation prolongée, une invalidité permanente ou

la nécessité de transfuser plus de 3 culots globulaires en 24 heures) apparaissent chez 10% des patients à 30 jours et 6% entre 30 jours et 1 an [53,64]. Les saignements gastro-intestinaux représentent près de la moitié des complications hémorragiques.

L'apparition de micro-saignements cérébraux est un phénomène normal lié au vieillissement [65]. Cependant, ils peuvent être associés à la survenue d'AVC [66]. Dans une étude récente, Van Belle *et al.* [67] ont mis en évidence qu'un patient sur 4 avec SVA sévère et bénéficiant d'un TAVI présentait des micro-saignements cérébraux avant la procédure TAVI, et qu'un patient sur 4 développait de nouveaux micro-saignements dans un délai de 3 jours après le TAVI. Enfin, la mortalité toute cause est estimée à 46% dans les 5 ans après TAVI [68].

4. Marqueurs prédictifs des complications post-TAVI

4.1. Scores de risque

Afin d'évaluer le risque chirurgical peropératoire lors du TAVI, des scores ont été établis et sont utilisés dans la pratique clinique, comme le score de risque de la *Society of Thoracic Surgeons* (STS) qui prédit la mortalité peropératoire et le score *European system for cardiac operative risk evaluation* (EuroSCORE II) basé sur de nombreux paramètres cliniques tels que l'âge, la présence de comorbidités, les fonctions rénale et cardiaque [69]. Cependant, ces scores de risque prédisent le risque chirurgical mais présentent des performances médiocres quant à la prédiction du pronostic après TAVI [70]. Une méta-analyse récente portant sur 8 grandes études cliniques a même montré qu'il n'y avait pas de corrélation ou d'association entre le score STS et la mortalité ou la survenue d'AVC après TAVI [71]. Ainsi, des

biomarqueurs prédictifs du pronostic des patients à court et long terme après TAVI sont encore nécessaires.

4.2. Syndrome inflammatoire

Plus de 50% des patients développent une réponse inflammatoire systémique aseptique dans les 48 heures après TAVI, en absence de syndrome infectieux. Ce syndrome inflammatoire systémique met en jeu l'immunité innée et est caractérisé par des concentrations circulantes élevées de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 associées à une élévation de la concentration de leucocytes dans le sang ainsi que de la protéine C réactive (CRP) et de la procalcitonine dans le sérum [72]. Lorsque le syndrome inflammatoire est sévère, il est associé à la mortalité à 30 jours, 6 mois et 1 an après TAVI, surtout chez les patients diabétiques [73]. Les complications potentiellement engendrées par cette inflammation sont susceptibles d'être amplifiées chez les patients présentant une comorbidité pro-inflammatoire, comme les patients diabétiques. En effet, la présence d'un diabète est associée à un plus haut risque d'AVC suite au TAVI [74] et à une augmentation de la mortalité à 2 ans par rapport aux patients non diabétiques [75].

4.2.1. Protéine C réactive

Ce syndrome inflammatoire systémique pouvant être associé aux complications survenant après le TAVI, certaines équipes ont tenté de prédire les complications du TAVI à plus ou moins long terme (AVC, infarctus du myocarde (IDM), mortalité) en mesurant des biomarqueurs de

l'inflammation et du stress cardiovasculaire [76]. La CRP a tout d'abord été démontrée comme prédictive de la sévérité, de la progression et du pronostic de la SVA [77]. Les patients avec une SVA sévère ont une CRP significativement plus élevée que ceux avec une SVA légère à modérée, et la mortalité à 4 ans est plus importante chez les patients avec une CRP élevée [77]. Plusieurs autres études ont aussi démontré qu'une CRP avant TAVI élevée était associée à une surmortalité après TAVI [78,79]. L'albumine étant une protéine dont les concentrations circulantes baissent lors du syndrome inflammatoire et en cas de dénutrition, le ratio CRP-sur-albumine a aussi été étudié pour évaluer la fragilité des patients (caractérisée par une vulnérabilité augmentée aux facteurs de stress et liée à un état pro-inflammatoire et immunologique altéré ainsi qu'à une mortalité accrue lors de procédures invasives, et évaluée de manière subjective au lit du patient notamment par une restriction de mobilité, une faiblesse musculaire voire une cachexie) et prédire l'inflammation dans une cohorte de patients avec SVA sévère bénéficiant d'un TAVI [80]. Il a été observé qu'un ratio CRP-sur-albumine élevé était associé à une surmortalité 15 mois après TAVI et que c'était un outil simple et objectif pour évaluer la fragilité.

4.2.2. Marqueurs cellulaires

Récemment, Navani *et al.* [81] se sont intéressés au ratio concentration de plaquettes dans le sang sur concentration de lymphocytes sanguins (PSL), un marqueur inflammatoire associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de syndrome coronarien aigu [82], mais n'ont pas observé d'association entre ce ratio évalué avant TAVI et la survenue d'événements cardiovasculaires majeurs 30 jours après TAVI, dans une cohorte de 470 patients, alors que

Condado *et al.* [83] et Tosu *et al.* [84] ont respectivement observé une association positive entre le ratio PSL pré-procédural et la survenue d'événements cardiovasculaires majeurs 30 jours après TAVI dans une cohorte de 520 patients, et la survenue de complications cardiovasculaires 6 mois après TAVI dans une cohorte de 100 patients. Ces résultats contradictoires peuvent être expliqués par des différences dans les populations étudiées notamment au niveau du risque chirurgical ou du seuil utilisé pour le ratio PSL. Plusieurs équipes ont également étudié le ratio neutrophile-sur-lymphocyte (NSL) dans ce contexte et rapporté une association entre ce paramètre et la survenue de complications dans les 30 jours après TAVI, la survenue d'événement cardiovasculaire majeur un an après TAVI et la mortalité toutes causes confondues [83,85]. Très récemment, des résultats issus de l'étude PARTNER portant sur 5 881 patients ont montré une association du ratio NSL avec la mortalité et la réhospitalisation 3 ans après TAVI [86].

4.2.3. Marqueurs de stress cardiovasculaire

Plusieurs autres marqueurs inflammatoires ont été étudiés pour prédire le pronostic après TAVI. Les concentrations circulantes de *growth differentiation factor* (GDF)-15, cytokine inflammatoire et pro-apoptotique, seraient prédictives de la mortalité après un IDM et dans les syndromes coronariens aigus [87]. Deux études ont montré que les concentrations circulantes du récepteur à l'IL-1 exprimé par les cardiomyocytes, le *suppression of tumorigenicity* (ST)2, étaient prédictives de la mortalité à 30 jours après un IDM [88,89]. Le peptide natriurétique *N-terminal pro-brain natriuretic peptide* (NT-proBNP) est également un marqueur circulant bien connu pour le diagnostic de l'IDM [90]. Des concentrations élevées

pré-procédurales de ces différents marqueurs sont associées à un mauvais pronostic après TAVI [91–94].

En conclusion, ces données suggèrent qu'en plus des scores de risque, les biomarqueurs circulants peuvent aider à la prédiction des complications du TAVI. Cependant, de larges études randomisées sont nécessaires pour clarifier et confirmer leur valeur pronostique pour optimiser la prise en charge des patients [95].

LES MONOCYTES

1. Origine

Les monocytes sont des cellules du sang produites dans la moelle osseuse à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH), précurseurs communs de l'ensemble des cellules du sang. La différenciation à partir de la CSH en monocyte dure entre 5 et 7 jours et est possible grâce à l'action combinée de facteurs de croissance, le *granulocyte macrophage colony stimulating factor* GM-(CSF) et le *macrophage* (M)-CSF. Une fois produits, les monocytes sont continuellement relargués dans la circulation sanguine où ils constituent environ 10% de la population leucocytaire totale chez l'homme.

2. Fonctions physiologiques

2.1. Immunité innée et adaptative

Les monocytes font partie du système des phagocytes mononucléés et ont un rôle essentiel dans l'homéostasie tissulaire et l'immunité innée et adaptative (figure 5). Ils jouent un rôle important dans les défenses immunitaires et l'inflammation en détectant les signaux de danger dans leur environnement local, en éliminant les agents pathogènes et les débris cellulaires par phagocytose et en initiant l'immunité adaptative. Ils jouent aussi un rôle dans les processus de réparation tissulaire [96,97]. Lors d'une infection ou d'une lésion, ils sont rapidement recrutés dans les tissus où ils se différencient en macrophages ou cellules

dendritiques. Les macrophages tissulaires exerceront ensuite diverses fonctions selon leur localisation (phagocytose, sécrétion de cytokines pro- ou anti-inflammatoires, immunité adaptative, remodelage et réparation tissulaire).

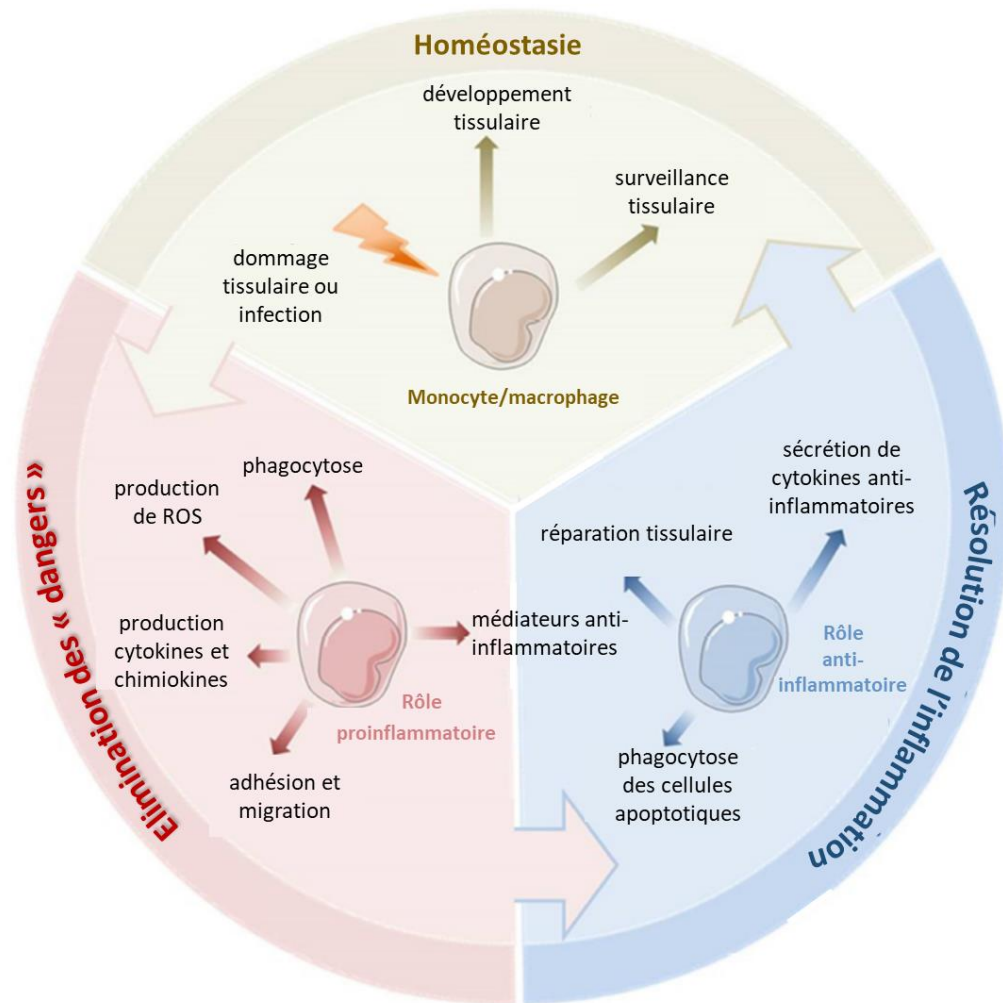


Figure 5 : Principales fonctions des monocytes/macrophages (adaptée d'Austermann *et al.*, Cells 2022 [98])

2.2. Immunothrombose

Des études récentes décrivent le lien étroit entre coagulation sanguine et immunité innée, sous le terme de « thromboinflammation » ou « immunothrombose » (figure 6). En effet, les monocytes activés expriment à leur surface du facteur tissulaire [99], qui a un rôle essentiel dans la cascade de coagulation, en activant le facteur VII initiateur de la coagulation *in vivo*, générant de la thrombine qui convertit le fibrinogène en fibrine, active le facteur XIII permettant la stabilisation du caillot de fibrine, amplifie la coagulation en activant les cofacteurs V et VIII et le facteur XI et active les plaquettes environnantes. Il a aussi été montré que les monocytes sont capables d'exprimer du facteur VIII en réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires [100] et de sécréter de l'activateur tissulaire du plasminogène, une sérine protéase qui convertit le plasminogène en plasmine entraînant la dégradation du caillot de fibrine, jouant un rôle clé dans la fibrinolyse [101]. Les monocytes peuvent être activés par des motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) et *damage-associated molecular patterns* (DAMPs)) reconnus notamment par les toll-like receptors (TLR) et sécréter des microvésicules exprimant du facteur tissulaire [102]. Les plaquettes et les neutrophiles ont aussi un rôle majeur dans l'immunothrombose [103,104]. Plusieurs études montrent qu'un processus d'immunothrombose aberrant pourrait contribuer à la formation du thrombus lors de pathologies inflammatoires comme l'athérosclérose [105] ou l'infection sévère à SARS-CoV-2 [106]. Dans le contexte de SVA, ce processus pourrait être impliqué dans la progression de la maladie et dans les complications thrombotiques et/ou hémorragiques observées après le TAVI.

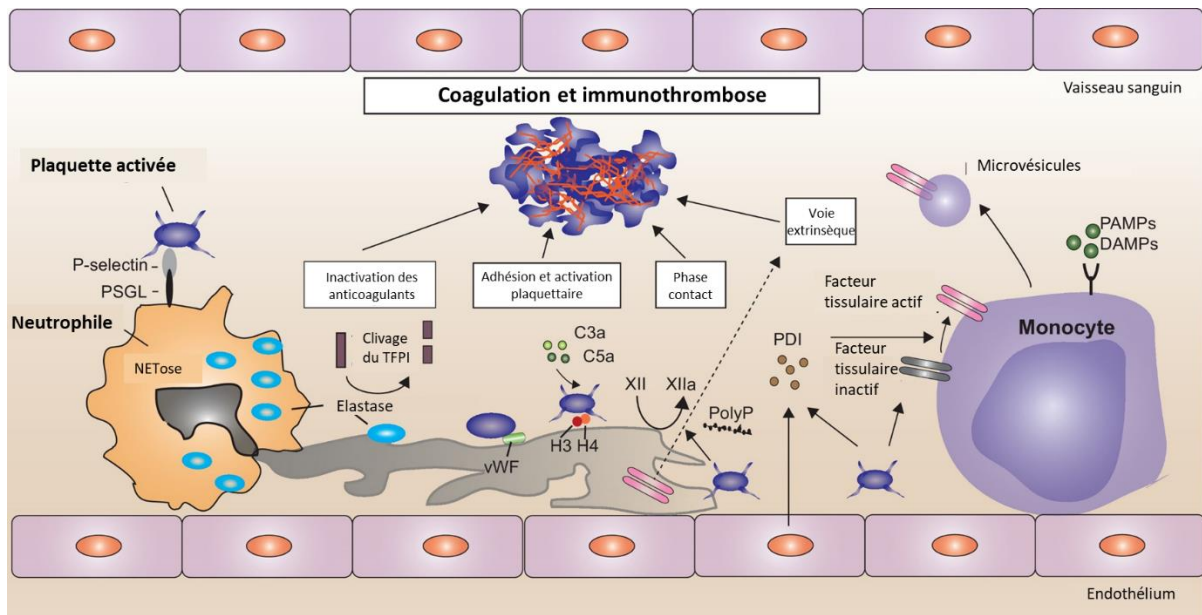


Figure 6 : Concept d'immunothrombose (adaptée de Gaertner et Massberg, Semin Immunol 2016 [102])

3. Hétérogénéité des monocytes humains

3.1. Sous-populations monocytaires

Chez l'homme, les monocytes sont classés en 3 sous-populations fonctionnelles, classification basée sur l'expression membranaire des clusters de différenciation CD14 (co-récepteur cellulaire du lipopolysaccharide) et CD16 (récepteur Fc γ RIII de faible affinité pour les IgG), aux phénotypes et fonctions différentes [14,97,107] (tableau II):

- les monocytes classiques (CD14⁺⁺ CD16⁻) sont des cellules à durée de vie courte (environ 24 heures dans la circulation). Ils sont rapidement mobilisés au niveau des sites infectés ou lésés et sont impliqués dans diverses fonctions de phagocytose,

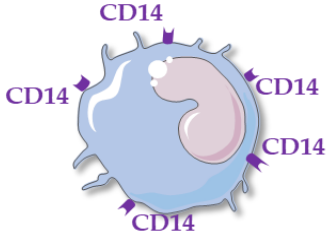
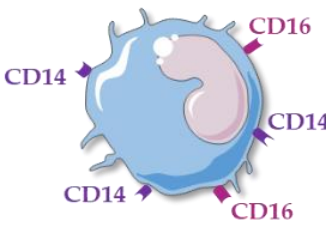
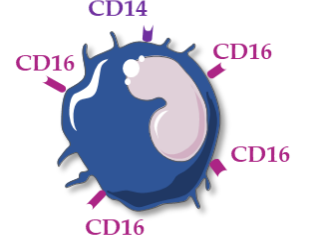
contrôle de l'infection, régulation de l'inflammation et réparation tissulaire. Parmi les 3 sous-populations monocytaires, c'est celle qui présente la plus grande capacité de migration tissulaire [108],

- les monocytes non-classiques (CD14⁺ CD16⁺⁺) ont un rôle de patrouilleur de l'endothélium et veillent à l'intégrité cellulaire et vasculaire. Ils ont une durée de vie d'environ 7 jours dans la circulation et peuvent être recrutés au niveau des sites de lésion vasculaire ou d'infection ou encore au niveau des sites inflammatoires comme les plaques d'athérosclérose [109],
- les monocytes intermédiaires (CD14⁺⁺ CD16⁺), qui sont décrits soit comme proches des monocytes classiques, soit comme proches des monocytes non classiques. Ils présentent une forte expression membranaire du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II de présentation à l'antigène, ce qui leur confère un rôle prédominant dans l'induction de la prolifération et la stimulation des cellules T. Ils sont recrutés à un stade plus tardif de l'inflammation.

Les monocytes classiques (CD16⁻) et intermédiaires/non classiques (CD16⁺) représentent respectivement 80-90% et 10-20% des monocytes totaux.

Tableau II : Principales caractéristiques des sous-populations monocytaires humaines.

ROS : *reactive oxygen species*

Sous-populations monocytaires	Monocytes classiques	Monocytes intermédiaires	Monocytes non classiques
Représentation schématique			
Récepteurs de surface	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺
Proportion des monocytes totaux	85–90%	5–10%	5–10%
Principales fonctions	Phagocytose, réparation tissulaire, inflammation, production de ROS	Présentation de l'antigène, prolifération et stimulation des cellules T, production de ROS, phagocytose	Patrouilleur de l'endothélium, clairance des cellules endothéliales apoptotiques, cicatrisation
Sécrétion de cytokines	IL-10, IL-6	TNF α , IL-1 β , IL-6	TNF α , IL-1 β , IL-6

3.2. Sécrétion des cytokines

Bien qu'un grand nombre d'études se soit intéressé à la différenciation des sous-populations monocytaires, aux mécanismes régulateurs de leur recrutement tissulaire et de leurs fonctions inflammatoires et immunes, plusieurs détails nécessitent encore des clarifications. En ce sens, Cormican et Griffin [110] ont relevé des points discordants dans la littérature qu'ils ont résumé dans une revue portant sur l'expression génique des sous-populations de monocytes et leur production de cytokines mesurée après tri cellulaire. Les plus importantes

discordances portent sur la production de cytokines pro-inflammatoires par les différentes sous-populations. Alors que Cros *et al.* [111] affirment que les monocytes classiques produisent les plus importantes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (*oxygen reactive species*, ROS) et que les monocytes intermédiaires ont la plus forte production de TNF α et IL-1 β mais ne produisent pas de ROS, Wong *et al.* [112] ont montré que le TNF α et l'IL-1 β sont produits majoritairement par les monocytes non classiques avec une faible production par les monocytes intermédiaires. Enfin, Zawada *et al.* [113] attestent que les monocytes classiques produisent la plus faible quantité de ROS, essentiellement produit par les monocytes intermédiaires. Il est important de noter que le manque de standardisation dans les protocoles de cytométrie en flux pour la séparation des 3 sous-populations de monocytes peut contribuer à des différences entre les études. Dans tous les cas, la différenciation des monocytes en sous-populations semble être étroitement régulée, mais les mécanismes de régulation sont encore peu compris.

4. Evolution des sous-populations en fonction des situations physiopathologiques

4.1. Sous-populations monocytaires et maladies cardiovasculaires

Plusieurs études ont déjà rapporté des variations de la répartition des sous-populations monocytaires dans diverses situations physiopathologiques comme les infections, les cancers ou les maladies inflammatoires ou auto-immunes [14], bien que leurs mécanismes de régulation restent encore incompris. La répartition des sous-populations a été identifiée comme un marqueur pronostique dans plusieurs pathologies cardiovasculaires causées par

l'athérosclérose comme la maladie coronarienne, l'AVC ou l'artériopathie oblitérante des membres inférieurs [12,114]. Ces études rapportent une association entre l'augmentation de la concentration circulante en monocytes intermédiaires et la sévérité ou les complications de ces pathologies [114–117]. Par exemple, dans leur cohorte prospective de 951 patients admis à l'hôpital pour angiographie coronaire, Rogacev *et al.* [118] ont montré qu'une concentration élevée de monocytes intermédiaires à l'inclusion était prédictive de la survenue de complications cardiovasculaires (décès par cause cardiovasculaire, IDM, AVC non hémorragique), après ajustement selon l'âge, le sexe, les concentrations circulantes de CRP, la concentration leucocytaire et la présence de comorbidités concomitantes comme le diabète, l'hypertension artérielle, le tabac, des concentrations élevées de cholestérol circulant, durant un suivi moyen de 3 ans. D'autres études ont aussi mis en évidence que des concentrations élevées de monocytes intermédiaires étaient associées au développement et à la stabilité des lésions athéroscléreuses [119], et notamment que la surexpression du TLR-4 sur les monocytes intermédiaires était associée à une plus grande vulnérabilité de la plaque coronarienne [120].

4.2. Sous- populations monocytaires et sténose valvulaire aortique

Alors que les données s'accumulent concernant le rôle clé des monocytes et macrophages dans la physiopathologie de la SVA et sa similarité dans de nombreux aspects avec celle de l'athérosclérose, très peu d'études existent à ce jour sur les concentrations circulantes des monocytes totaux et des sous-populations monocytaires chez les patients avec une SVA. Shimoni *et al.* [121] ont comparé une cohorte de 54 patients avec une SVA significative (10

avec une SVA modérée et 44 avec une SVA sévère) avec une cohorte de 33 patients aux facteurs de risque cardiovasculaires similaires mais sans pathologie valvulaire. Ils ont observé que les patients avec SVA avaient des concentrations plus élevées de monocytes totaux comparées à la population contrôle avec une corrélation inverse entre les taux de monocytes et la surface de la valve aortique. Efe *et al.* [122] ont observé dans leur cohorte de 178 patients avec SVA (111 patients avec une SVA mineure à modérée et 67 avec une SVA sévère) et 139 contrôles appariés sur l'âge et le sexe sans SVA, des taux plus élevés de monocytes totaux circulants chez les patients avec SVA sévère comparés aux patients avec SVA mineure à modérée, eux-mêmes ayant des taux plus élevés que la population contrôle. Ils ont également observé que le ratio taux circulant de lymphocyte sur taux circulant de monocytes (ratio LSM) était plus bas chez les patients avec SVA sévère comparé à celui des patients avec SVA mineure à modérée, lui-même plus bas que celui de la population contrôle. Les sous-populations monocytaires n'ont pas été étudiées dans ces 2 études. Hewing *et al.* [123] ont montré dans leur cohorte de 100 patients avec SVA comparés à des contrôles sans SVA que les concentrations circulantes de monocytes intermédiaires étaient augmentées chez les patients avec SVA sévère alors qu'il n'y avait pas de différence pour les concentrations des 2 autres sous-populations. Cette différence entre les groupes était indépendante de l'âge, du sexe, de l'indice de masse corporelle, du cholestérol, du NT-proBNP, de la classification cardiaque de la New York Heart Association (NYHA) et des taux de créatinine.

4.3. Sous-populations monocytaires et TAVI

4.3.1. Variation des sous-populations après TAVI

Quelques équipes se sont intéressées à la variation des sous-populations monocytaires avant et après TAVI qui pourrait être induite par le changement brutal des conditions hémodynamiques (normalisation de la pulsatilité artérielle et réduction soudaine du shear stress). À notre connaissance, seules 4 études à ce jour reportent ces variations et associent les concentrations des sous-populations pré- ou post-procédurales avec le pronostic après TAVI (tableau III). Premièrement, Hewing *et al.* [123] ont comparé les sous-populations monocytaires avant (T0), 3 mois et 6 mois après un remplacement valvulaire, dans une cohorte de 69 patients avec SVA sévère dont 44 ont bénéficié d'un TAVI et 25 d'un remplacement valvulaire par abord chirurgical. Dans les 2 groupes, ils n'ont pas observé de différence de concentration des monocytes totaux à 3 et 6 mois après TAVI par rapport à T0. Par contre, ils ont observé une diminution de la concentration absolue des monocytes intermédiaires à 3 et 6 mois par rapport à T0 pour les patients TAVI, et à 6 mois pour les patients chirurgicaux. La concentration absolue des monocytes classiques et non classiques ainsi que les marqueurs inflammatoires (CRP, IL-6, TNF α) sont restés stables dans les 2 groupes.

Neuser *et al.* [124] ont comparé les sous-populations monocytaires avant TAVI (T0) et entre 4 et 7 jours après TAVI, dans une cohorte de 57 patients. Ils ont aussi observé une diminution significative de la concentration absolue des monocytes intermédiaires alors que les concentrations des autres sous-populations monocytaires et des monocytes totaux sont

restées stables. Les concentrations circulantes de la CRP augmentaient après TAVI mais n'étaient pas corrélées à la concentration de monocytes intermédiaires.

Enfin, Hoffmann *et al.* [125] ont comparé les sous-populations monocytaires à T0 avant TAVI et 24 heures et 3 jours après TAVI dans une cohorte de 129 patients. Ils ont observé une augmentation significative des concentrations de monocytes classiques et intermédiaires à 24 heures suivie par une augmentation des concentrations de monocytes non classiques 3 jours après TAVI.

Il est très difficile de comparer les études entre elles car ce ne sont pas les mêmes temps après TAVI qui ont été étudiés ni la même durée de suivi et le même type de complications. Cependant, toutes ces études rapportent un impact du TAVI sur les monocytes intermédiaires avec une augmentation précoce après la procédure et une diminution quelques jours et mois après TAVI.

4.3.2. Association avec le pronostic après TAVI

Les études détaillées précédemment ont également analysé l'association entre les concentrations circulantes des sous-populations monocytaires et la survenue de complications et/ou la mortalité après TAVI. Neuser *et al.* [124] ont observé qu'une concentration élevée de monocytes intermédiaires pré-procédurale était associée à une moins bonne fonction cardiaque et à une plus faible probabilité d'obtenir une amélioration de la classification NYHA 3 mois après TAVI. Pour Hoffman *et al.* [125], une concentration élevée de monocytes non classiques 24 heures après un TAVI était associée à la mortalité toutes causes confondues à 12 mois, même après exclusion des patients décédés dans les 30

premiers jours et il y avait une tendance à l'association entre une concentration élevée de monocytes intermédiaires pré- et post-procédurale et la mortalité à 12 mois.

Pfluecke *et al.* [126] ont seulement étudié le pronostic associé aux sous-populations monocytaires sans comparer les temps de prélèvements entre eux. Ils ont comparé les 3 sous-populations à T0 avant TAVI, à 24 heures et 7 jours après TAVI avec la mortalité à 3 mois après TAVI dans une cohorte de 120 patients avec SVA sévère. Ils ont observé que les concentrations circulantes de monocytes intermédiaires et non classiques étaient plus élevées à T0 chez les patients décédés dans les 3 mois après TAVI que chez les patients survivants. Il n'y avait pas de différence significative pour les 3 sous-populations à 24 heures et 7 jours entre les survivants et les non survivants, excepté pour les monocytes classiques à 24 heures dont les concentrations étaient plus élevées chez les survivants. Une concentration élevée de monocytes intermédiaires pré-procédurale était aussi associée à la mortalité à 3 mois, après ajustement sur l'âge, la fraction d'éjection ventriculaire gauche, la CRP, l'IL-8 et l'expression monocyttaire du CD11b, marqueur d'activation cellulaire. Dans la même cohorte, Cybularz *et al.* [127] ont étudié l'association de la fragilité des personnes âgées avec les concentrations circulantes des sous-populations monocytaires et ont observé des concentrations plus élevées de monocytes intermédiaires chez 28 patients fragiles comparés aux 92 patients non fragiles. Les concentrations circulantes de monocytes intermédiaires étaient de plus un marqueur prédictif de la mortalité à 6 mois après TAVI après ajustement sur la fragilité et la CRP.

Tableau III : Evolution des concentrations circulantes des sous-populations monocytaires (valeurs absolues, par rapport à T0 avant TAVI chez les patients avec SVA bénéficiant d'un TAVI. L'âge, le score STS et l'EuroSCORE sont présentés en moyenne ± déviation standard ou médiane (interquartiles) selon les données disponibles. * : après TAVI ; ↗ : augmentation ; ↘ : diminution

Nombre; Origine des patients	Age; Sexe	Score STS (%) EuroSCORE II (%)	Temps de prélèvement	Monocytes classiques	Monocytes intermédiaires	Monocytes non classiques	Association avec le pronostic	Référence
44; Allemagne, mono- centrique	80.2 ± 6.1; 50% hommes	2.5 (1.4–3.9); 3.6 (2.3–5.7)	T0 3 mois * 6 mois *	=	↘	=	Non étudié	Hewing <i>et al.</i> [123]
57; Allemagne, mono- centrique	83.3 ± 0.79; 47% hommes	5.97 ± 0.39; 6.71 ± 0.65	T0 J4 à J7 *	=	↘	=	Concentrations élevées de monocytes intermédiaires pré-procédurales associées à une moins bonne fonction cardiaque et une plus faible probabilité d'atteindre une amélioration de la classification NYHA 3 mois après TAVI	Neuser <i>et al.</i> [124]
120; Allemagne, mono- centrique	81; 33% hommes	>4	T0 24h * J7 *	Pas de comparaison entre les temps			Concentrations élevées de monocytes intermédiaires pré-procédurales associées à la mortalité à 3 mois	Pfluecke <i>et al.</i> [126] Cybularz <i>et al.</i> [127]
129; Allemagne, mono- centrique	83 (79–86); 76% hommes	3.41 (2.45–4.94) 3.31 (2.31–6.04)	T0 24h * J3 *	↗	↗	↗	Concentrations élevées de monocytes intermédiaires pré- et post-procédurales tendent à être associées à la mortalité à 12 mois et concentrations élevées post- procédurales de monocytes non classiques associées à la mortalité à 12 mois	Hoffmann <i>et al.</i> [125]

4.3.3. Hypothèses sur les mécanismes de régulation

Les mécanismes impliqués dans la modulation des concentrations sanguines de monocytes intermédiaires pendant le TAVI restent spéculatifs. La procédure TAVI entraîne de soudains changements hémodynamiques au niveau des forces de cisaillement et du flux sanguin associés à une réponse inflammatoire. On peut supposer que des concentrations augmentées de monocytes intermédiaires, juste après TAVI, sont le résultat à la fois des perturbations hémodynamiques importantes et de la réponse inflammatoire. Pour aller plus loin dans la compréhension de l'impact du shear stress sur les fonctions monocytaires, Baratchi *et al.* [128] ont comparé le statut d'activation des monocytes chez des patients avec SVA sévère avant TAVI (shear stress important) et après TAVI (normalisation du shear stress). Ils ont montré que les monocytes étaient plus activés avant TAVI qu'un mois après TAVI, avec une activité de phagocytose et une capacité d'adhésion plus importantes, une internalisation plus élevée des *low density lipoprotein* (LDL) oxydées ainsi qu'une sécrétion plus élevée de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IFN β 1, TNF α). Ces résultats ont été confirmés ensuite grâce à un système microfluidique reproduisant les forces de cisaillement observées avant et après TAVI. Les auteurs ont identifié le récepteur calcique mécano-sensitif Piezo-1 comme un médiateur essentiel de la réponse au shear stress, récepteur exprimé à la surface des monocytes et dont l'expression était sous-exprimée après TAVI. Cibler ce récepteur avec des agents pharmacologiques pour inhiber l'activation monocyttaire pourrait constituer une nouvelle perspective thérapeutique dans la SVA. Il est intéressant d'observer que toutes les études portant sur les sous-populations monocytaires et le TAVI rapportent une association entre les concentrations pré- ou post-procédurales des monocytes intermédiaires et la survenue de

complications 3, 6 ou 12 mois après TAVI. Ces résultats concordent avec les études ayant montré une association entre les concentrations circulantes de monocytes intermédiaires et la survenue d'événements cardiovasculaires [114], mais ces études observationnelles ne permettent pas de comprendre si la modulation des concentrations circulantes de monocytes intermédiaires après TAVI sont à l'origine des complications ou si elles sont seulement une conséquence de la procédure en elle-même. Des études supplémentaires sont nécessaires pour comprendre comment ces modulations peuvent influencer sur des événements survenant de manière tardive [12]. De plus, la petite taille des cohortes étudiées dans le cadre du TAVI constitue une limite de ces études. Ces résultats devront être confirmés dans des cohortes plus larges et longitudinales avant de considérer les concentrations circulantes des monocytes intermédiaires comme un facteur de risque et comme une cible thérapeutique pour réduire la progression de la SVA et la survenue de complications après TAVI. Enfin, il faut noter que l'impact des sous-populations monocytaires dans la survenue des complications hémorragiques et thrombotiques après TAVI n'a pas encore été décrit alors que ces complications sont fréquentes et que les monocytes ont un rôle clé dans le processus de thromboinflammation.

5. Traitement préventif de l'inflammation lors du TAVI

Le TAVI étant associé à une réponse inflammatoire systémique chez plus de 50% des patients, et sachant que les monocytes semblent jouer un rôle important dans cette réponse inflammatoire, la mise en place d'une thérapie préventive anti-inflammatoire ciblant les monocytes peut être discutée.

Des études récentes ont montré que la modulation du phénotype des monocytes et des processus inflammatoires était efficace pour réduire la taille des lésions athéroscléreuses dans des modèles précliniques, diminuer le risque de survenue d'événements cardiovasculaires et améliorer le pronostic clinique chez les patients atteints de maladies cardiovasculaires [129,130]. L'exemple le plus abouti est celui du canakinumab, anticorps monoclonal anti-IL-1 β , cytokine pro-inflammatoire majoritairement sécrétée par les monocytes et les macrophages. Une large étude clinique (10 061 patients), l'étude CANTOS (*Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study*), a prouvé l'efficacité de cet anticorps dans la réduction du risque cardiovasculaire, particulièrement chez les patients avec des marqueurs d'inflammation élevés [131,132]. D'autres approches thérapeutiques ciblant les monocytes dans le contexte de l'athérosclérose ont été proposées, par exemple en bloquant les motifs chimiokine C-C receptor 2 (CCR2) / C-C ligand 2 (CCL2) qui médient le recrutement des monocytes, en utilisant des petits ARNs interférant (small-interfering RNAs, siRNAs), des anticorps monoclonaux, des antagonistes du CCR2 ou des inhibiteurs du *monocyte chemoattractant protein* (MCP)-1 [133,134].

L'effet des statines a été prouvé depuis longtemps dans la réduction de la morbidité et l'amélioration de la survie globale des patients à haut risque cardiovasculaire en réduisant les taux de LDL cholestérol et en stabilisant voire réduisant les plaques d'athérome coronariennes [135,136], mais elles ne semblent pas avoir d'effet concernant le risque cardiovasculaire dans la SVA [137]. Il doit cependant être souligné que les données sur l'effet des statines sur la répartition des sous-populations monocytaires sont rares et controversées [138]. De plus, dans le contexte de patients bénéficiant d'un TAVI, l'utilisation de statines est associée à une réduction de la mortalité toutes causes confondues par rapport aux patients sans statines

[139,140]. Sasaki *et al.* [141] ont également étudié l'utilisation d'un traitement anti-athérosclérotique, combinant des antiagrégants plaquettaires, des statines et des inhibiteurs du système rénine-angiotensine-aldostérone, prescrit après TAVI, et ont montré que les patients bénéficiant de cette thérapie avaient un taux de survie à 2 ans 2 fois supérieur à celui des patients contrôle.

Enfin, une thérapie préventive anti-inflammatoire peut être discutée chez les patients présentant une comorbidité pro-inflammatoire préexistante, qui pourrait amplifier les complications liées au TAVI. Par exemple, la présence d'un diabète est associée à un plus haut risque d'AVC post-procédural [74] et à une mortalité à 2 ans supérieure [75]. Comme décrit plus tôt, le mécano-récepteur Piezo-1, hautement exprimé sur la surface des monocytes, a été identifié comme un médiateur essentiel du shear stress et de l'inflammation [128]. Il pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans le TAVI.

L'HÉMATOPOÏÈSE CLONALE DE SIGNIFICATION INDÉTERMINÉE

1. Généralités

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production des diverses cellules sanguines à partir de la CSH, cellule capable d'auto-renouvellement et de différenciation, située au sommet de l'organisation hiérarchique pyramidale du système hématopoïétique. L'acquisition de mutations somatiques dans l'ADN et notamment dans les CSH est un phénomène inexorable qui évolue avec l'âge [142–144]. Si l'une de ces mutations confère un gain de compétitivité à la cellule dans laquelle elle s'est développée, cette dernière générera un clone et entraînera une expansion de CSH mutées, qu'on appelle hématopoïèse clonale [145]. Elle peut être à l'origine d'hémopathies malignes caractérisées par la surreprésentation d'une population cellulaire sanguine mutée dérivée d'un clone, avec un risque annuel de progression de 0,5 à 1% [146].

On appelle hématopoïèse clonale de signification indéterminée (*clonal hematopoiesis of indeterminate potential*, CHIP) la présence de mutations somatiques dans les CSH, fréquemment retrouvées dans les hémopathies malignes, mais sans aucune pathologie hématologique associée chez le patient. Les gènes les plus fréquemment mutés dans la CHIP sont les gènes DNA-Méthyltransférase 3A (*DNMT3A*) et Tet Methylcytosine Dioxygénase 2 (*TET2*), codant pour des protéines impliquées dans la méthylation des cytosines de l'ADN et ainsi la régulation épigénétique de l'ADN [147,148]. *DNMT3A* est l'enzyme principale responsable de la méthylation *de novo* des cytosines et *TET2* catalyse l'oxydation des méthylcytosines entraînant une déméthylation de l'ADN [18]. D'autres gènes sont

fréquemment mutés dans la CHIP comme par exemple les gènes Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1 (*ASXL1*), Tumor Protein 53 (*TP53*), Janus Kinase 2 (*JAK2*), Protein Phosphatase Mg²⁺/Mn²⁺ Dependent 1D (*PPM1D*) ou Splicing Factor 3b Subunit 1 (*SF3B1*) et sont impliqués dans les leucémies aiguës myéloïdes et les syndromes myélodysplasiques [149,150].

Les CSH donnant naissance aux cellules de l'immunité innée telles que les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes, la CHIP est susceptible de moduler le phénotype de ces cellules. *DNMT3A* et *TET2* sont notamment impliqués dans la régulation du phénotype inflammatoire des monocytes. Ainsi, depuis quelques années, plusieurs études ont montré des associations entre la présence d'une CHIP et la survenue et le pronostic de pathologies non hématologiques aux composantes inflammatoires, notamment les maladies cardiovasculaires (figure 7) [151,152].

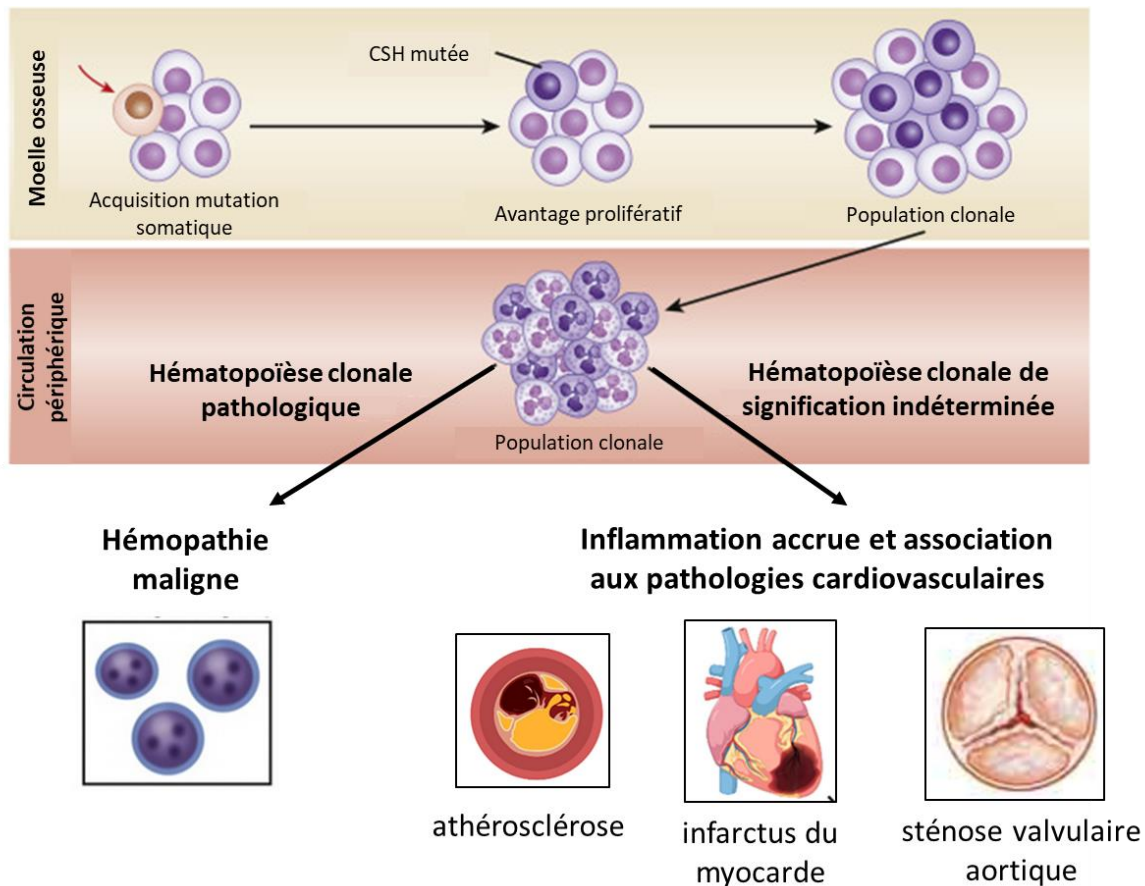


Figure 7 : Hématopoïèse clonale, prédisposition aux pathologies hématologiques et association aux pathologies cardiovasculaires (adaptée de Marnell *et al.*, J Mol Cell Cardiol 2021 [153])

La prévalence de la CHIP augmente avec l'âge, et est estimée, respectivement, à 5,6%, 9,5%, 11,7% et 18,4% dans la population âgée de 60 à 69 ans, 70 à 79 ans, 80 à 89 ans et de plus de 90 ans [146]. La fréquence allélique de la mutation (*variant allele frequency, VAF*) définit le nombre d'allèles qui présentent la mutation, ce qui correspond au double de cellules mutées de façon hétérozygote (puisque chaque cellule présente 2 allèles, une VAF à 2% correspond à 4% de cellules mutées). La majorité des études utilise un seuil de VAF à 2%, considérant qu'une VAF <2% est à très faible risque d'entraîner des conséquences cliniques [146,154,155]. Cependant, ce seuil reste arbitraire, et il a déjà été montré que même une CHIP

à faible VAF, entre 0,5 et 2%, était associée à un mauvais pronostic dans les pathologies cardiovasculaires [156].

2. CHIP et inflammation

Les CSH étant à l'origine des cellules immunes circulantes, la CHIP impacte les fonctions immunitaires, notamment l'immunité innée. Elle est plus fréquente dans les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et les cellules NK que dans les lymphocytes B et T [157]. De plus, *DNMT3A* semble être impliqué de manière multipotente dans les lignées hématopoïétiques alors que *TET2* agit plus en aval et semble être plus spécifique de la lignée myéloïde [158]. Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression et/ou de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes chez des patients porteurs d'une mutation de *DNMT3A* ou *TET2*. Le profil transcriptomique de patients atteints d'insuffisance cardiaque et mutés pour *DNMT3A* étudié par Abplanalp *et al.* [159,160] a mis en évidence une surexpression monocyttaire des interleukines IL-1 β , IL-6, IL-8, du complexe de l'inflammasome NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) et des chimiokines CCL3 et CCL4. *TET2* a un rôle anti-inflammatoire et est impliqué dans la résolution de l'inflammation en diminuant l'expression de l'IL-6 et de l'IL-1 β dans les cellules myéloïdes [161,162]. Ainsi, la perte de fonction de *TET2*, étudiée dans des modèles murins, entraîne une surexpression des cytokines pro-inflammatoires par les monocytes/macrophages, notamment d'IL-1 β médiée par l'inflammasome NLRP3 [163,164]. Enfin, les mutations de *JAK2* entraînent aussi une augmentation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [165], et Wolach *et al.* [166] ont montré que la mutation *JAK2* V617F était responsable d'une formation

accrue de pièges extracellulaires des neutrophiles (*neutrophil extracellular traps*, NETs), promoteur de thrombose. L'impact sur l'inflammation des autres gènes impliqués dans la CHIP comme *ASXL1*, *PPM1D*, *TP53* ou *SF3B1* a été encore peu étudié.

3. CHIP et maladies cardiovasculaires

3.1. Athérosclérose et sténose valvulaire aortique

La CHIP a été identifiée depuis quelques années comme un facteur de risque lié à l'âge des maladies cardiovasculaires liées à l'athérosclérose et de leur morbi-mortalité, dont la prévalence mondiale permet l'étude de larges cohortes [16,17]. Des approches expérimentales basées sur des modèles murins ont indiqué que la CHIP induisait une athérogénèse accélérée causée par un état pro-inflammatoire et profibrotique médié par les monocytes et macrophages clonaux infiltrés dans les lésions athéroscléreuseuses [18,158,163,164]. L'étude cas-contrôle de Jaiswal *et al.* incluant 4 726 patients et 3 529 contrôles a permis de mettre en évidence que les patients porteurs d'une CHIP dans les gènes *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1* ont deux fois plus de risque de développer une maladie coronarienne que la population contrôle [151] alors que la mutation *JAK2* V617F entraîne un risque 12 fois supérieur de développer une coronaropathie.

Peu d'études se sont intéressées à la CHIP dans la SVA. Abplanalp *et al.* [155] ont étudié 3 patients avec SVA et 3 patients sains en séquençage ARN single-cell, et ils ont observé que les patients SVA porteurs d'une mutation dans *DNMT3A* ou *TET2* avaient une expression monocyttaire augmentée de l'IL-1 β , du récepteur à l'IL-6 et de NLRP3 par rapport à ceux avec

une CHIP négative, sans distinguer les patients porteurs d'une mutation dans *DNMT3A* de ceux porteurs d'une mutation dans *TET2*.

3.2. TAVI

Une seule étude dans la littérature s'est intéressée à la CHIP dans un contexte de SVA et de TAVI. Ainsi Mas-Peiro *et al.* [167] a évalué l'incidence de la CHIP dans une cohorte de 279 patients atteints de SVA sévère et bénéficiant d'un TAVI, ainsi que son association avec les concentrations circulantes de monocytes avant TAVI et la mortalité à 8 mois après TAVI. Ils ont reporté la présence de mutations dans *DNMT3A* et/ou *TET2* avec une VAF $\geq 2\%$ chez un tiers de leurs patients, avec une incidence qui augmente avec l'âge (de 25% pour les patients âgés de 55 à 79 ans à 53% pour les patients >90 ans). La présence de mutations dans *DNMT3A* et/ou *TET2* était associée à une surmortalité toutes causes confondues à 8 mois après TAVI comparé aux patients sans mutation. Chez les patients porteurs d'une mutation *TET2*, ils ont observé une augmentation des concentrations circulantes de monocytes non classiques avant TAVI par rapport aux patients sans mutation. Puisque les monocytes non classiques sécrètent des cytokines pro-inflammatoires [168], ces données appuient la composante inflammatoire délétère pour le pronostic après TAVI. Cependant, cette étude n'a porté que sur les gènes *DNMT3A* et *TET2* et non pas le profil complet de CHIP des patients et n'a pas distingué les patients porteurs de mutations dans *DNMT3A* de ceux porteurs de mutations dans *TET2* pour l'étude d'association avec la mortalité. L'effet des mutations hors *DNMT3A* et *TET2* et la distinction entre ces 2 gènes sur le pronostic des patients avec SVA sévère bénéficiant d'une procédure TAVI restent encore à étudier.

CHAPITRE 1 : Modulation du phénotype hémostatique et inflammatoire des monocytes après TAVI et impact sur les complications post-procédurales

Introduction

La SVA, pathologie valvulaire qui touche 2 à 7% des sujets de plus 70 ans, entraîne une perturbation du flux sanguin caractérisée par une faible pulsatilité artérielle et des contraintes de cisaillement élevées. Lorsque la pathologie devient symptomatique, la mortalité à 2 ans est de 50% en l'absence de traitement. Le seul traitement efficace est le remplacement de la valve sténosée par voie chirurgicale ou percutanée (TAVI). Le TAVI a révolutionné la prise en charge des patients atteints de forme sévère de la SVA. Cette procédure permet, de manière instantanée, la réouverture de la valve et la correction de la pulsatilité et des contraintes de cisaillement. Cependant, le TAVI est responsable d'une réaction inflammatoire systémique chez plus de 50% des patients et les complications post-procédurales hémorragiques et thrombotiques sont fréquentes. Les mécanismes impliqués dans ces complications sont encore mal connus. De nombreux travaux rapportent les liens étroits entre les processus d'hémostase et ceux de l'inflammation, notamment via les monocytes (immunothrombose). Notre objectif était d'étudier l'effet de la procédure TAVI sur le phénotype des monocytes circulants pour comprendre les mécanismes impliqués dans les complications post-procédurales et identifier de nouvelles pistes thérapeutiques.

Matériel et méthodes

Population d'étude

Les patients étudiés étaient issus de la cohorte WITAVI (NCT02628509), étude clinique observationnelle prospective réalisée au CHU de Lille dont l'objet principal était l'étude des anomalies de multimérisation du VWF dans les pathologies cardiovasculaires, notamment chez des patients avec une SVA sévère et nécessitant un remplacement de valve par TAVI. Nous avons suivi la survenue d'événements hémorragiques et/ou thrombotiques pendant un mois ainsi que la mortalité à un an après TAVI.

Etude des monocytes circulants

Pour tous les patients, une numération formule sanguine (NFS) a été réalisée sur un tube EDTA prélevé au début de la procédure TAVI (T0) et 18 à 24 heures après la procédure (J1). Les NFS ont été réalisées sur un automate XN-10 (Sysmex, Kobe, Japon).

Aux mêmes temps d'étude, une analyse par cytométrie en flux de la répartition des 3 sous-populations monocytaires a été réalisée. Le panel d'anticorps utilisé pour le marquage est décrit dans le tableau IV. Le cytomètre utilisé était le Navios® (Beckman Coulter, Miami, FL, USA) en configuration 3 lasers (émettant à 405nm, 488nm et 638nm) et 10 couleurs. Les données ont été acquises après obtention d'au moins 40 000 monocytes.

Tableau IV : Panel d'anticorps utilisés pour l'analyse des différentes sous-populations de monocytes circulants par cytométrie en flux.

AF750 : alexa fluor 750, APC : allophycocyanine, KO : krome orange, NK : natural killer, PB : pacific blue, PC 5.5 : phycoérythrine cyanine, PE : phycoérythrine.

Anticorps	Fluorochrome	Cibles cellulaires	Clone	Dilution	Fournisseur
CD2	PE	Lymphocytes T et NK	RPA-2.10	1/10	Biolegend
CD24	PC 5.5	Lymphocytes B	SN3	1/5	Abcam
CD56	APC	Lymphocytes NK	NCAM 16.2	1/5	Biosciences
CD14	AF750	Monocytes	RMO 52	1/20	Beckman Coulter
CD16	PB	Lymphocytes NK, certains monocytes et certaines cellules dendritiques	3G8	1/5	Biolegend
CD45	KO	Leucocytes	J.33	1/5	Beckman Coulter

Analyse transcriptomique des monocytes classiques

Pour 12 patients (4 hommes et 8 femmes) issus de la cohorte de 37, 2 tubes Cell Preparation Tube (CPT) Vacutainer® de 8 ml (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ont été prélevés aux même temps d'étude T0 et J1. Ce tube permet d'isoler facilement les cellules mononucléées sanguines circulantes ou PBMC (*peripheral blood mononuclear cell*), c'est-à-dire les lymphocytes et les monocytes, via un gradient de densité de type Ficoll. Les culots cellulaires ont été conservés dans des cryotubes de 10 millions de cellules dans une solution comprenant 90% de sérum de veau fœtal (Eurobio, Courtabeuf, France) et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Thermo Fischer scientific, Courtabeuf, France), et congelés de manière progressive à -80°C pendant 24 heures puis dans l'azote liquide.

Nous avons ensuite réalisé un tri cellulaire pour séparer les différentes populations cellulaires, notamment les 3 sous-populations monocytaires (ainsi que les lymphocytes CD4, CD8 et les

cellules dendritiques). Après décongélation des culots cellulaires, les cellules ont été préparées et marquées avec le panel d'anticorps décrit dans le tableau V. Le tri cellulaire a été réalisé en collaboration avec l'équipe 3 de l'unité Inserm UMR 1011 sur la plateforme de tri cellulaire d'EGID (*European Genomic Institute for Diabetes*), sur le trieur BD Influx (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

Tableau V : Panel d'anticorps utilisé pour le tri cellulaire.

AF700 : alexa fluor 700, APC-Fire : allophycocyanine-fire, BUV : brillant ultraviolet, V500 : violet 500, BV : brillant violet, FITC : isothiocyanate de fluorescéine, NK : natural killer, PE : phycoérythrine, PE-CF594 : phycoérythrine couplée à la cyanine-based fluorescent, PE-Cy5 : phycoérythrine couplée à la cyanine 5.

Anticorps	Fluorochrome	Cibles cellulaires	Clone	Dilution	Fournisseur
CD11c	BUV395	Cellules dendritiques	B-ly6	1/100	BD Biosciences
Zombie UV	BUV496	Viabilité cellulaire		1/1000	Biolegend
CD8	BUV737	Lymphocytes T cytotoxiques	SK1	1/500	BD Bioscience
CD16	V500	Monocytes intermédiaires et non classiques, cellules dendritiques, lymphocytes NK	3G8	1/800	BD Biosciences
CD15	BV786	Neutrophiles	HI98	1/500	BD Biosciences
CD14	FITC	Monocytes	61D3	1/200	eBioscience
CD66b	PE	Granulocytes	G10F5	1/100	Biolegend
CD3	PE-CF594	Lymphocytes T	UCHT1	1/200	BD biosciences
CD4	APC-Cy7	Lymphocytes T et monocytes	OKT4	1/250	Biolegend
CD56	BV605	Lymphocytes NK	HCD56	1/200	Biolegend
HLA-DR	AF700	Monocytes et macrophages	G46-6	1/250	eBioscience
CD45	PE-Cy5	Leucocytes	HI30	1/200	Biolegend

L'extraction de l'ARN des 3 sous-populations monocytaires triées a été réalisée sur colonne Zymo direct-zol RNA Microprep (Zymo Research, Irvine, CA, USA), en suivant les instructions du fabricant. Afin de s'assurer de la qualité et de la quantité de l'ARN obtenu, la mesure du *RNA Integrity Number* (RIN) a été réalisée sur Bioanalyser (Agilent, Massy, France). L'analyse transcriptomique a ensuite été réalisée sur les monocytes classiques avec le kit GeneChip™ WT Pico Reagent Kit sur puce Affymetrix GeneChip™ HumanGene 2.0 ST Array (ThermoFisher) en collaboration avec l'équipe 4 de l'unité Inserm UMR 1011. Le logiciel de bioinformatique Galaxy a été utilisé pour l'interprétation des résultats de transcriptomique ainsi que les bases de données GeneCard et Metascape.

Analyse de l'expression de la thrombomoduline

Pour 6 patients supplémentaires, 3 hommes et 3 femmes dont l'âge médian était de 82 ans, une analyse par cytométrie en flux de la co-expression de la thrombomoduline et des monocytes classiques a été réalisée à T0 et J1. Le panel d'anticorps utilisé pour le marquage est le même que celui du tableau IV, avec en supplément le CD141 (marqueur de la thrombomoduline, clone 1A4, BD Biosciences) marqué au BB515 (brilliant blue 515) et dilué au 1/10.

Résultats

Patients

Nous avons inclus dans notre étude 37 patients dont la moyenne d'âge était de 84 ans (± 6 ans) et composée à 30% d'hommes. Leurs caractéristiques cliniques et biologiques avant TAVI sont présentées dans le tableau VI.

Tableau VI : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients inclus. Les variables continues sont présentées sous forme de médiane (interquartile) et les variables catégorielles sous forme de valeur absolue (pourcentage).

Caractéristiques générales	n=37
Age (années)	84 (80 – 89)
Sexe (hommes)	11 (31%)
Antécédents cliniques	
Indice de masse corporelle (kg/m ²)	26,5 (23,0 – 30,8)
Tabac	1 (3%)
Diabète	13 (35%)
Hypertension artérielle	26 (70%)
Dyslipidémie	15 (41%)
Insuffisance rénale	4 (11%)
Insuffisance cardiaque	10 (27%)
Coronaropathie	8 (22%)
Antécédent d'accident vasculaire cérébral	3 (8%)
Fibrillation auriculaire	18 (49%)
Surface aortique (cm ²)	0,66 (0,49 – 0,80)
Traitement anticoagulant	21 (57%)
Paramètres biologiques avant TAVI (G/L)	
Leucocytes (G/L)	6,2 (5,1 – 7,2)
Neutrophiles (G/L)	4,0 (3,1 – 5,6)
Lymphocytes (G/L)	1,4 (1,0 – 1,7)
Monocytes (G/L)	0,5 (0,4 – 0,6)
Monocytes classiques (G/L)	0,436 (0,374 – 0,511)
Monocytes intermédiaires (G/L)	0,023 (0,011 – 0,036)
Monocytes non classiques (G/L)	0,048 (0,026 – 0,62)
Plaquettes (G/L)	216 (174 – 249)

Évolution de la répartition des sous-populations monocytaires après TAVI

A J1, nous avons observé une augmentation des concentrations circulantes de monocytes totaux par rapport à T0, liée à une augmentation des concentrations de monocytes classiques et intermédiaires (respectivement, 0,436 (0,374-0,511) vs 0,708 (0,532-0,927) G/L, $p < 0.0001$; 0,023 (0,011-0,036) vs 0,035 (0,03+-0,059) G/L, $p < 0.0001$) (figure 8). Les concentrations de monocytes non classiques restaient stables.

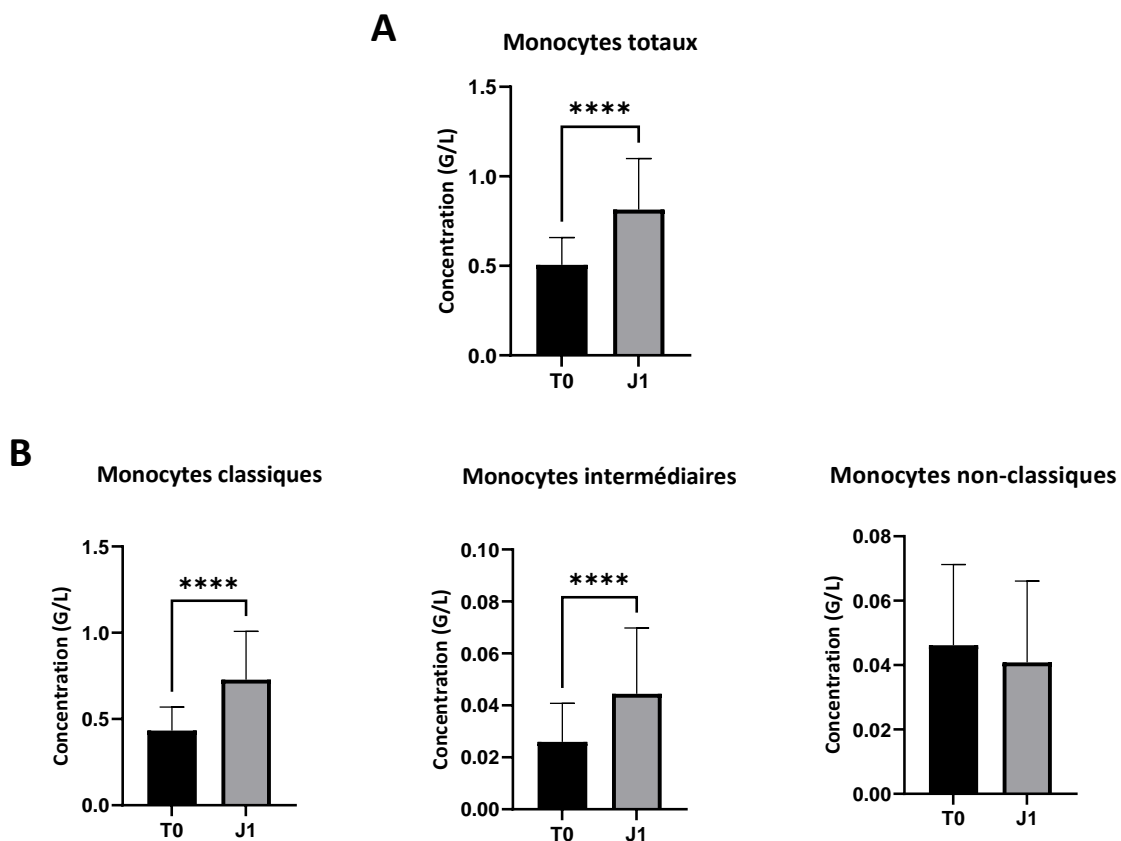


Figure 8 : Évolution entre T0 (avant TAVI) et J1 (le lendemain du TAVI) (A) des monocytes totaux ; (B) des sous-populations monocytaires. **** : $p < 0,0001$

Nous avons aussi observé une baisse significative des concentrations de lymphocytes à J1 (1,4 (0,95-1,65) vs 1,0 (0,70-,130) G/L, $p < 0,001$), qui, conjuguée à l'augmentation des monocytes

totaux, entraîne une diminution significative du ratio LSM (2,6 (1,9-3,9) vs 1,2 (0,9-1,9), $p < 0,0001$) (figure 9).

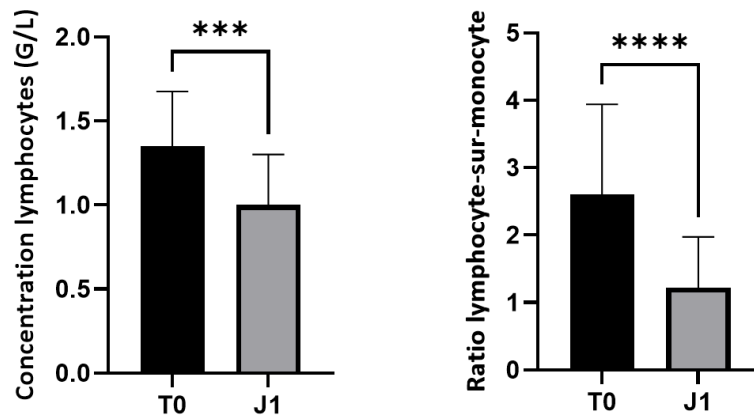


Figure 9 : Évolution entre T0 (avant TAVI) et J1 (le lendemain du TAVI) des concentrations circulantes de lymphocytes et du ratio lymphocyte-sur-monocyte. * : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$**

Dans le mois suivant le TAVI, 6 patients (6 femmes, 86 ans \pm 4 ans) ont présenté des complications hémorragiques (ecchymoses cervicales et oropharyngées, transfusion de culots globulaires) ou thrombotiques (AVC). La survenue de ces complications à un mois était associée à un taux élevé de monocytes classiques post-procédural (J1) (figure 10A). Nous avons aussi suivi la mortalité toute cause à un an après TAVI. Six patients incluant 4 femmes et 2 hommes sont décédés (87 ans \pm 8 ans). Une concentration élevée de monocytes intermédiaires pré-procédurale (T0) était associée à une surmortalité à un an (figure 10B). Aucune association significative n'a été observée entre les ratios LSM, NSL et PSL à T0 ou J1 et la survenue de complications à 1 mois ou la mortalité à 1 an du TAVI.

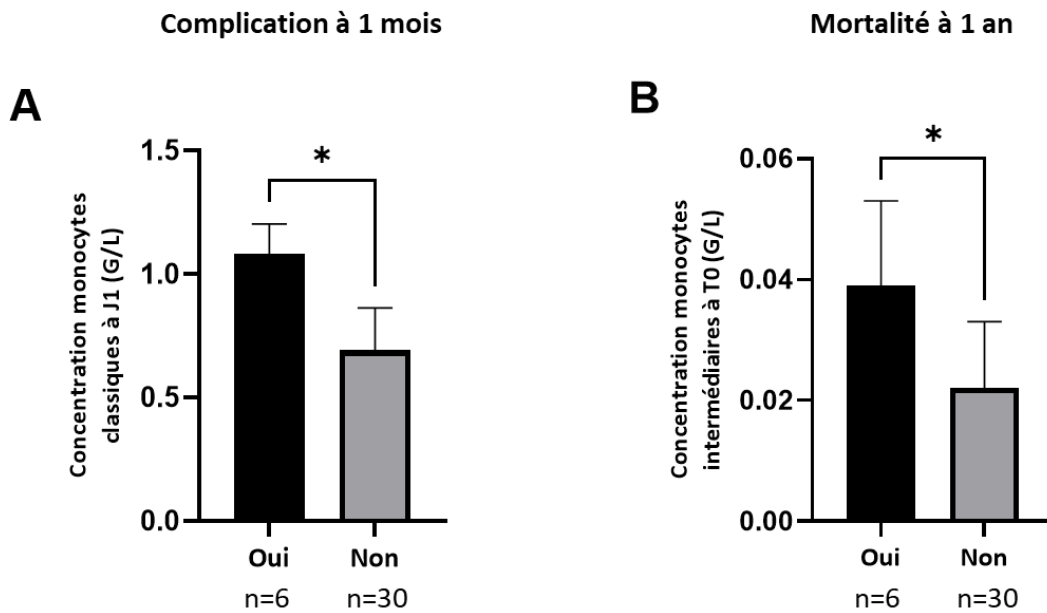
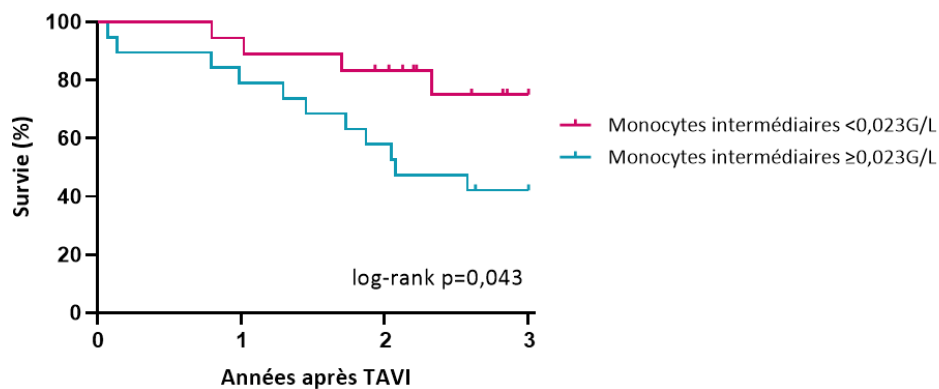


Figure 10 : (A) Concentrations circulantes des monocytes classiques à J1 selon la survenue de complications hémorragiques et/ou thrombotiques un mois après TAVI. (B) Concentration des monocytes intermédiaires à T0 selon la mortalité à un an après TAVI. * : $p < 0,05$

Pour confirmer l'effet péjoratif des monocytes intermédiaires, nous avons étudié la survie globale des 37 patients à plus long terme, soit 3 ans après le TAVI (médiane de suivi 2,5 ans), par une analyse de Kaplan-Meier en fonction de la médiane de concentration des monocytes intermédiaires à T0 qui était de 0,023G/L (figure 11). Nous avons observé une association significative entre un taux supérieur à la médiane des monocytes intermédiaires à T0 et une survie globale diminuée à 3 ans (HR : 0,33 [95% CI : 0,12-0,90], $p=0,043$).



Monocytes intermédiaires <0,023G/L	18	18	15	6
Monocytes intermédiaires ≥0,023G/L	19	15	12	7

Figure 11 : Analyse de survie Kaplan-Meier des patients avec SVA sévère durant 3 années de suivi après le TAVI, selon la médiane de concentration des monocytes intermédiaires à T0.

Résultats de l'analyse transcriptomique

Avant de réaliser l'analyse transcriptomique des monocytes isolés des patients bénéficiant d'un TAVI, les RIN des échantillons ont été mesurés afin de s'assurer de la qualité et de la quantité de l'ARN extrait des monocytes triés. Les quantités de monocytes intermédiaires et non classiques triés étaient insuffisantes pour extraire une quantité suffisante d'ARN de bonne qualité pour la transcriptomique. Les résultats des RIN des monocytes classiques sont présentés dans le tableau VII. Un RIN supérieur à 7 (où 1 montre un ARN totalement dégradé et 10 un ARN de très bonne qualité) est nécessaire pour réaliser ensuite les analyses de transcriptomique.

Tableau VII : RIN des ARN extraits des monocytes classiques isolés de patients avant et après TAVI.
H : homme, F : femme, RIN : RNA integrated number.

Patient	Âge (ans)	Sexe	Nombre de monocytes classiques isolés		RIN	
			T0	J1	T0	J1
P1	81	H	757 603	1 084 291	9	9,2
P2	90	H	795 414	1 344 640	8,4	9,5
P3	87	H	751 550	759 778	10	10
P4	77	F	216 176	428 222	10	9,2
P5	84	H	568 746	325 926	9,3	8,8
P6	81	F	1 185 374	1 462 576	9,3	9,2
P7	90	F	797 845	1 827 023	7,9	8,4
P8	87	F	242 813	566 370	8,2	8,7
P9	89	F	212 809	232 830	8,7	9,4
P10	71	F	158 244	562 767	8,4	9,4
P11	83	F	297 829	168 478	9,7	9,0
P12	71	F	143 068	260 525	8,0	8,4

L'analyse transcriptomique des monocytes classiques nous a permis d'observer qu'à J1, 267 gènes étaient surexprimés et 28 sous-exprimés par rapport à T0, avec un rapport de variation (ou fold change (FC)) supérieur à 1,5 et une différence d'expression significative ($p < 0,05$). La figure 12 représente le « volcano plot », où les gènes sont distribués selon leur « fold change » en abscisse et la « p-value » en ordonnée. Les points colorés correspondent aux gènes dont le FC est supérieur au seuil de 1,5.

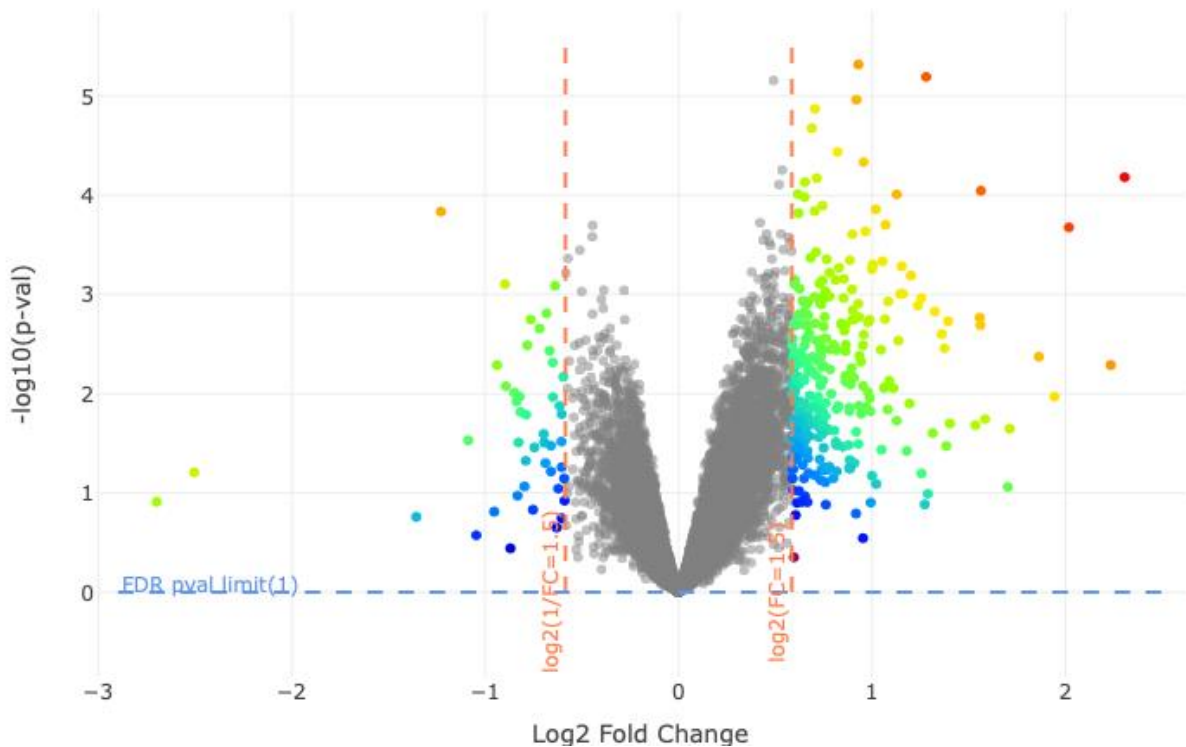


Figure 12 : Volcano plot des gènes différentiellement exprimés dans les monocytes classiques à J1 après TAVI par rapport à T0. Les gènes sont représentés selon leur taux de variation en abscisse et leur différence d'expression en ordonnée.

L'analyse des voies enrichies par *gene ontology* (GO) des gènes surexprimés dans les monocytes classiques à J1 par rapport à T0 a été réalisée grâce au logiciel Metascape [169]. Elle a révélé que les gènes les plus significativement surexprimés après TAVI dans les monocytes classiques codaient pour des protéines impliquées dans l'activation leucocytaire et la réponse inflammatoire, mais aussi dans la régulation de la production de cytokines, la réponse aux bactéries, l'activation des macrophages ou encore la phagocytose (figure 13).

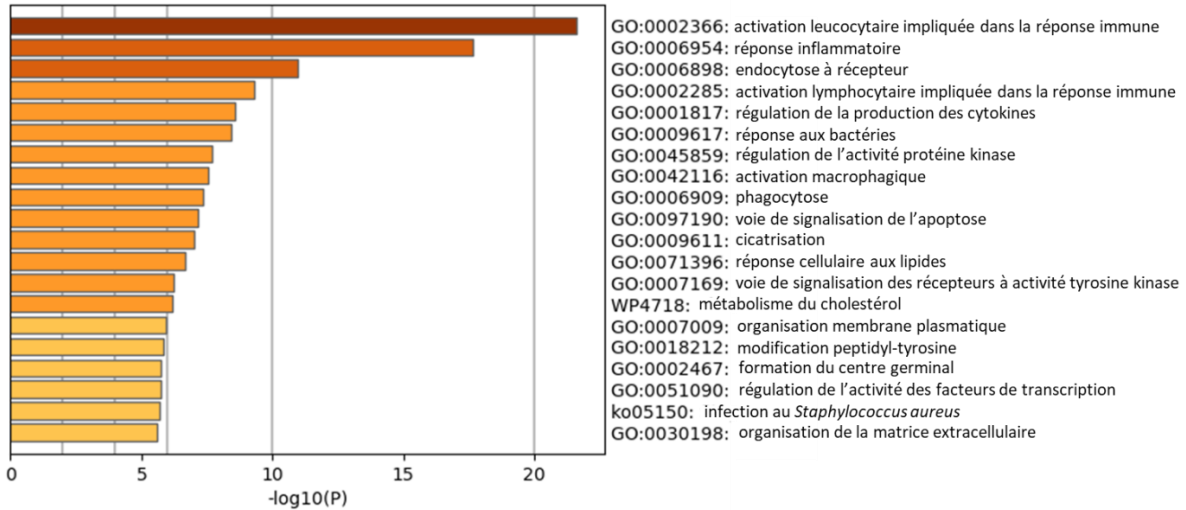


Figure 13 : Analyse d'enrichissement des gènes surexprimés à J1 par rapport à T0

Les gènes les plus différenciellement exprimés à J1 par rapport à T0 sont listés dans les tableaux VIII (gènes surexprimés à J1) et IX (gènes sous-exprimés à J1).

Tableau VIII : Liste des gènes surexprimés dans les monocytes classiques à J1 par rapport à T0

Gène	Dénomination	FC	p-value	FDR p-value
<i>METTL7B</i>	methyltransferase like 7B	4,942	6,58E-05	0,1076
<i>FAM20A</i>	FAM20A golgi associated secretory pathway pseudokinase	4,701	0,0051	0,2704
<i>MS4A4A</i>	membrane spanning 4-domains A4A	4,046	0,0002	0,1454
<i>ADM</i>	adrenomedullin	3,844	0,0107	0,32
<i>PIM1</i>	Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	3,634	0,0042	0,253
<i>NAMPT</i>	nicotinamide phosphoribosyltransferase	3,274	0,0226	0,3781
<i>CLU</i>	clusterin	2,997	0,0180	0,3594
<i>PAG1</i>	phosphoprotein membrane anchor with glycosphingolipid microdomains 1	2,953	9,00E-05	0,1098
<i>JAK3</i>	Janus kinase 3	2,947	0,0020	0,2235
<i>LDLR</i>	low density lipoprotein receptor	2,94	0,0017	0,2234

Tableau IX : Liste des gènes sous-exprimés dans les monocytes classiques à J1 par rapport à T0

Gène	Dénomination	FC	p-value	FDR p-value
<i>SLC35G5</i>	Solute Carrier Family 35 Member G5	-2,343	0,0001	0,1236
<i>HLA-DQA2</i>	Major Histocompatibility Complex, Class II, DQ Alpha 2	-2,124	0,0295	0,4048
<i>ZNF430</i>	Zinc Finger Protein 430	-1,916	0,0052	0,2704
<i>OXER1</i>	Oxoeicosanoid Receptor 1	-1,863	0,0008	0,206
<i>CKS2</i>	CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2	-1,857	0,0084	0,3018
<i>PRSS21</i>	Serine Protease 21	-1,801	0,0097	0,3152
<i>KRTAP10-6</i>	Keratin Associated Protein 10-6	-1,786	0,0119	0,3239
<i>ALDH1A1</i>	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A1	-1,774	0,0310	0,4109
<i>JUNB</i>	Transcription Factor Jun-B	-1,768	0,0107	0,32
<i>ZNF284</i>	Zinc Finger Protein 284	-1,762	0,0153	0,3406

Les monocytes étant des acteurs essentiels de l'immuno-thrombose, nous nous sommes intéressés plus spécifiquement aux gènes impliqués dans la coagulation (GO:0007596). Seulement 14 gènes étaient dérégulés à J1 par rapport à T0 (13 surexprimés et 1 sous-exprimé), avec un seuil de FC abaissé à 1,2. Ils sont présentés dans le tableau X.

Tableau X : Liste des gènes surexprimés et sous-exprimés dans les monocytes classiques à J1 par rapport à T0

	Gène	Dénomination	FC	p-value	FDR p-value
SUREXPRIMÉS	<i>THBD</i>	Thrombomoduline	1,885	0,0015	0,0633
	<i>F5</i>	Facteur V	1,742	0,0029	0,0633
	<i>GAS6</i>	Growth Arrest Specific 6	1,398	0,0041	0,0633
	<i>ANXA5</i>	Annexin A5	1,364	0,0451	0,3473
	<i>ITPK1</i>	Inositol-Tetrakisphosphate 1-Kinase	1,359	0,0026	0,0633
	<i>CD36</i>	Glycoprotéine IV	1,328	0,0078	0,1005
	<i>CD59</i>	MAC-Inhibitory Protein	1,303	0,0134	0,1277
	<i>AP3B1</i>	Adaptor Related Protein Complex 3 Subunit Beta 1	1,280	0,0856	0,4711
	<i>DTNBP1</i>	Dystrobrevin Binding Protein 1	1,260	0,0118	0,1277
	<i>ENPP4</i>	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 4	1,243	0,1611	0,6505
	<i>BLOC1S6</i>	Biogenesis Of Lysosomal Organelles Complex 1 Subunit 6	1,227	0,0783	0,4711
	<i>GNAQ</i>	G Protein Subunit Alpha Q	1,227	0,2385	0,7652
	<i>F13A1</i>	Coagulation Factor XIII A Chain	1,205	0,4298	0,9762
SOUS-EXPRIMÉ	<i>F2RL3</i>	F2R Like Thrombin	-1,336	0,0036	0,0633

Les résultats bruts de différence d'expression du gène *THBD* de la thrombomoduline en transcriptomique entre T0 et J1 sont présentés dans la figure 14A ($p < 0,01$). Cette différence significative d'expression n'a cependant pas été confirmée en cytométrie en flux sur de nouveaux patients (figure 14B).

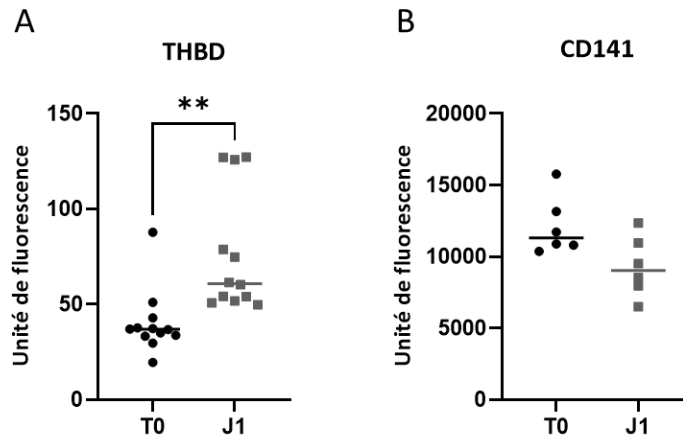


Figure 14 : (A) Expression du gène *THBD* sur les monocytes classiques analysée en transcriptomique entre T0 et J1 après TAVI (n=12) ; (B) Expression du CD141 à la surface des monocytes totaux analysée en cytométrie en flux (n=6).

Discussion

La SVA est la première valvulopathie mondiale, et sa prise en charge reste interventionnelle ou chirurgicale. Le TAVI s'est considérablement développé ces dernières années, mais reste associé à des complications ischémiques ou hémorragiques qui aggravent le pronostic de certains patients. Les mécanismes impliqués dans ces complications sont encore mal connus. De nombreux travaux rapportent les liens étroits entre les processus d'hémostase et ceux de l'inflammation, notamment via les monocytes, qu'on appelle immunothrombose. Les anomalies hémodynamiques liées à la SVA pourraient modifier le phénotype des monocytes circulants et impacter les processus d'immunothrombose. Peu de données sont retrouvées dans la littérature concernant ces mécanismes. Par la restauration immédiate de la pulsativité du flux sanguin et la réduction du shear stress, le TAVI constitue un excellent modèle d'étude chez l'homme de modification du flux.

Nous avons observé une augmentation des concentrations circulantes de monocytes 24 heures après le TAVI, en particulier des monocytes classiques et intermédiaires. Cette augmentation pourrait provenir d'un relargage splénique d'un pool de monocytes (lié à une hématopoïèse extramédullaire) ou d'une augmentation des progéniteurs myéloïdes, ces deux mécanismes ayant été observés dans des modèles murins d'infarctus du myocarde [170]. Les variations hémodynamiques du flux sanguin intervenant au cours de la procédure TAVI pourraient aussi expliquer la mobilisation des monocytes, qui ne serait pas uniquement liée à l'inflammation. Il a notamment été observé une démargination de stress des monocytes et une diminution de leur adhésion à l'endothélium vasculaire liées aux perturbations du flux sanguin chez des volontaires sains réalisant un exercice de haute intensité, avec une augmentation concomitante des taux circulants de MCP-1 alors que l'IL-6 restait stable [171,172], mais cette augmentation des concentrations de monocytes régressait dans ce modèle dès la normalisation du flux (en 20 minutes), ce qui n'est pas le cas dans notre étude. La baisse de la concentration des lymphocytes circulants pourrait s'expliquer par une augmentation de l'apoptose de ces cellules, comme cela a déjà été observé dans d'autres pathologies cardiovasculaires [173]. L'association entre les sous-populations monocytaires et les complications hémorragiques ou thrombotiques à un mois du TAVI ainsi que la mortalité à 1 an pourrait s'expliquer par les processus d'immuno-thrombose dans lesquels les monocytes jouent un rôle essentiel. Les monocytes intermédiaires semblent être les plus associés à un mauvais pronostic des patients, ce qui concorde avec les résultats retrouvés dans la littérature.

Il serait intéressant de pouvoir suivre l'évolution des concentrations circulantes des sous-populations monocytaires à des temps plus tardifs après le TAVI (une semaine, un mois)

mais cela nécessiterait de reconvoquer les patients, la durée d'hospitalisation pour TAVI au CHU de Lille étant la plupart du temps très courte (2 jours) grâce à l'optimisation de la procédure. De plus, l'absence de standardisation dans les protocoles de cytométrie en flux pour la séparation des 3 sous-populations de monocytes constitue une limite de notre étude, en effet nous avons observé un continuum d'expression de CD14 et CD16 rendant difficile la séparation des monocytes intermédiaires et non classiques. Des travaux récents suggèrent que l'utilisation de marqueurs additionnels tels que CCR2, CD36 ou SLAN (6-Sulfo LacNAc) permettrait de mieux séparer les monocytes intermédiaires des monocytes non classiques [174,175].

Concernant l'analyse transcriptomique, notre objectif initial était de comparer la variation du transcriptome des monocytes entre T0 et J1 après TAVI initialement chez des patients sans complication, puis dans un second temps chez des patients ayant présenté des complications ischémiques ou hémorragiques post-procédurales dans le premier mois afin de mettre en évidence d'éventuels marqueurs précoces qui pourraient prédire l'apparition de ces complications et adapter la prise en charge des patients concernés. Cependant, la procédure TAVI est pratiquée depuis plus de 10 ans au CHU de Lille et a été considérablement perfectionnée. La survenue de complications ischémiques et hémorragiques s'est ainsi réduite et les 12 patients analysés en transcriptomique n'en ayant pas développées, cette étude n'a pas pu être réalisée. Nous avons toutefois observé des différences significatives entre T0 et J1 sur le transcriptome des monocytes classiques prouvant ainsi que la modification brutale du flux sanguin entraînée par le TAVI a un impact sur les cellules circulantes et notamment sur les fonctions monocytaires, puisque nous avons observé une surexpression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, la régulation de la production de cytokines, la

réponse aux bactéries, l'activation des macrophages et la phagocytose. En restreignant notre analyse aux gènes de la coagulation, nous avons observé une surexpression de la thrombomoduline à J1 par rapport à T0. Présente à la surface des monocytes, la thrombomoduline est le récepteur de la thrombine et lorsque cette dernière s'y lie, elle active la protéine C de manière considérablement plus efficace que sans cette liaison [176]. Elle exerce ainsi une puissante action anticoagulante. La thrombomoduline exerce aussi un rôle anti-inflammatoire par divers mécanismes. Elle active la protéine C qui inhibe la production monocyttaire de TNF α induite par le *nuclear factor* (NF)- κ b [177]. Elle active aussi le *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI), zymogène circulant qui va ensuite inhiber la fibrinolyse et inactiver les médiateurs du complément C3a et C5a [178]. Il serait aussi intéressant de comparer l'expression de la thrombomoduline chez des patients ayant présenté des complications hémorragiques ou thrombotiques post-procédurales. Etant surexprimée à J1 chez nos 12 patients qui n'ont pas présenté de complications, on pourrait émettre l'hypothèse d'un effet protecteur de la thrombomoduline grâce à ses effets anti-inflammatoire et anticoagulant. Il serait donc intéressant de vérifier si les patients présentant des complications à 1 mois du TAVI auraient par exemple une absence de surexpression voire une sous-expression de la thrombomoduline.

En conclusion, nous avons montré que le phénotype des monocytes circulants était modulé par le TAVI, avec une modification de la répartition des sous-populations monocytaires et du transcriptome. Acteurs essentiels de l'immuno-thrombose, les monocytes pourraient être impliqués dans la survenue des complications post-procédurales hémorragiques et thrombotiques, dont les mécanismes restent encore méconnus. Ces résultats préliminaires restent à confirmer sur un plus grand nombre de patients.

CHAPITRE 2 : Hématopoïèse clonale de signification indéterminée et sténose valvulaire aortique : prévalence élevée, large spectre de mutations et mauvais pronostic des variants *TET2* sur la mortalité à long terme après TAVI

Overwhelming negative impact of TET2 mutations on long-term mortality after transcatheter aortic valve replacement

Introduction

La SVA est la pathologie valvulaire acquise la plus fréquente chez le sujet âgé. Conséquence d'un processus actif de calcification de la valve et médiée par une inflammation chronique et des contraintes de flux élevées, cette pathologie présente de nombreuses similarités avec l'athérosclérose [179]. La CHIP est définie par la présence de mutations somatiques dans les cellules souches hématopoïétiques sans pathologie hématologique maligne associée. Elle est présente chez 10 à 20% des sujets de plus de 70 ans en population générale et a été récemment identifiée comme un nouveau facteur de risque d'athérosclérose. Une étude récente a rapporté la présence d'au moins une CHIP dans les gènes *DNMT3A* et/ou *TET2* chez un tiers des patients avec une SVA sévère et un risque accru de mortalité à 8 mois chez les patients porteurs de CHIP après un TAVI [167], procédure de remplacement de valve percutanée associée dans plus de 50% des cas à une réaction inflammatoire systémique. Cependant, cette étude s'est limitée aux 2 gènes les plus fréquemment mutés en CHIP et n'a

donc pas fourni de profil mutationnel complet des autres gènes déterminant dans la CHIP, potentiellement impliqués dans la SVA et leur impact clinique. De plus, les effets de *DNMT3A* et *TET2* n'ont pas été dissociés alors que ces 2 gènes ont des effets divergents sur les CSH [180], la méthylation de l'ADN et les processus inflammatoires [18]. Il est ainsi intéressant de les étudier séparément. Les objectifs de cette étude étaient d'établir le profil complet de CHIP chez des patients atteints de SVA et bénéficiant d'un TAVI, de déterminer si la présence d'une CHIP était associée à un état inflammatoire accru après la procédure TAVI et d'associer sa présence à la mortalité à long-terme. Nous avons aussi voulu évaluer l'impact clinique des mutations de CHIP avec une VAF sous le seuil de 10%, considéré comme une faible VAF, et distinguer l'impact de *DNMT3A* et de *TET2* sur le pronostic des patients à 5 ans.

Matériel et méthodes

Population d'étude

Une cohorte rétrospective de 266 patients avec SVA sévère et bénéficiant d'un TAVI au CHU de Lille entre 2011 et 2020 a été étudiée. Les patients ont été inclus à partir de 3 études cliniques différentes (NCT02628509, NCT02972008 et NCT03728049). Tous les patients ont fourni un consentement éclairé. Les données cliniques et biologiques ont été collectées au moment de l'admission pour TAVI. L'analyse moléculaire a été réalisée de manière rétrospective en octobre 2021 sur un prélèvement réalisé juste avant la procédure TAVI. Huit patients ont finalement été exclus pour présence d'une maladie hématologique maligne préexistante. Cette étude est conforme aux principes énoncés dans la Déclaration d'Helsinki.

Analyse moléculaire par séquençage haut-débit

L'ADN des patients a été extrait selon les procédures standards du laboratoire et a été étudié par séquençage haut-débit par méthode de capture, en collaboration avec l'équipe d'oncohématologie du Pr Claude Preudhomme (Centre de Biologie Pathologie, CHU Lille). Les librairies ont été préparées avec le kit Twist® NGS target enrichment solution (Twist BioScience, San Francisco, CA, USA) selon les instructions du fabricant pour un panel de 67 gènes (annexe 1) et ont ensuite été séquencées sur le séquenceur NovaSeq® (Illumina, San Diego, CA, USA). Les données brutes ont été triées, filtrées et étudiées avec les pipelines d'analyse MuTect2 et Vardict et le logiciel développé au CHU de Lille « NGS report ». Une couverture d'au minimum 1500 reads a été obtenue pour tous les gènes. Les variants retenus pour l'interprétation étaient observés avec un minimum de 25 reads. L'interprétation des variants a été effectuée en considérant les fréquences alléliques mineures dans la base de données de polymorphismes GnomAd (les variants avec une fréquence >2% dans la population générale étaient exclus), les VAF, ainsi que la fréquence de ces variants et leur interprétation clinique selon la base de données du laboratoire d'oncohématologie. Les variants non-sens (entraînant un codon stop immédiat) et « frameshift » (entraînant un codon stop prématuré par décalage du cadre de lecture) étaient toujours considérés comme pathogènes. Des prédictions *in silico* ont aussi été réalisées sur les variants faux-sens (remplacement d'un acide aminé par un autre) et les variants d'épissage.

Dosages biologiques

Les échantillons sanguins ont été prélevés au début de la procédure TAVI (T0) et entre 24 et 72 heures après la procédure. Les NFS ont été réalisées sur un automate XN-10 (Sysmex, Kobe,

Japon), ainsi qu'un dosage de CRP sur un automate Cobas (Roche, Boulogne-Billancourt, France). Pour 24 patients, un dosage des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α a été réalisé à T0 en utilisant le système ELLA Automated Immunoassay (ProteinSimple, San Jose, CA, USA) qui permet, de manière automatisée, de réaliser des dosages ELISA de différentes cytokines en parallèle (système multi-analytique).

Analyses statistiques

Les variables continues sont exprimées en médiane (interquartiles) et les variables catégorielles en fréquences (pourcentage). La distribution gaussienne a été testée selon le test de normalité de Shapiro-Wilk. Des tests de Mann-Whitney ou t-test (variables continues) et des tests du Chi² ou tests de Fisher (variables catégorielles) ont été utilisés pour les comparaisons entre les groupes. Des analyses de Kaplan-Meier ont été utilisées pour les analyses de survie au sein des différents groupes. Le test du Log-rank a été appliqué pour la comparaison des courbes de survie. Une analyse multivariée a été réalisée par régression Cox pour évaluer l'effet potentiel des variables confondantes sur la mortalité. Une p-value inférieure à 0,05 était considérée comme significative. Les analyses statistiques ont été réalisées avec les logiciels GraphPad Prism 9.3 (San Diego, CA, USA) et SPSS 24.0 (Chicago, IL, USA).

Résultats

Prévalence élevée de CHIP chez les patients avec SVA sévère

La cohorte initiale était composée de 111 hommes et 155 femmes. Huit patients (4 hommes et 4 femmes) ont été exclus en raison de la présence d'une pathologie hématologique maligne

préexistante. Au final, la cohorte était composée de 107 hommes et 151 femmes dont l'âge médian était de 84 ans (79 – 87). Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau XI.

Tableau XI : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients CHIP-positif et CHIP-négatif.
Les variables continues sont exprimées en médiane (interquartiles) et les variables catégorielles en fréquences (pourcentage). AVC : accident vasculaire cérébral, CHIP : hématoïèse clonale de signification indéterminée, CRP : protéine C réactive, IMC : indice de masse corporelle, VWF : facteur von Willebrand,

Caractéristiques	Total des patients	Patients CHIP-positif	Patients CHIP-négatif	p-value patients CHIP-positif versus CHIP-négatif
Nombre de patients	258	191	67	
Sexe (hommes)	107 (42%)	76 (40%)	31 (46)	0,389
Age médian, années	84 (79 – 87)	84 (80 – 87)	82 (76 – 86)	0,036
<ul style="list-style-type: none"> • ≤ 69 ans • 70 – 79 ans • 80 – 89 ans • ≥ 90 ans 	13 (5) 57 (22) 160 (62) 28 (11)	7 (4) 39 (20) 123 (64) 22 (12)	6 (9) 18 (27) 37 (55) 6 (9)	0,198
Comorbidités et facteurs de risque cardiovasculaires				
IMC (kg/m ²)	27,2 (23,7 – 30,1)	27,1 (23,5 – 29,9)	27,6 (23,8 – 31,9)	0,451
Tabac	32 (12)	23 (12)	9 (13)	0,514
Diabète	75 (29)	57 (30)	18 (27)	0,755
Hypertension artérielle	192 (74)	140 (73)	52 (78)	0,520
Dyslipidémie	123 (48)	87 (46)	36 (54)	0,258
Fibrillation auriculaire	82 (32)	64 (33)	18 (27)	0,361
Insuffisance rénale	113 (44)	85 (45)	28 (42)	0,775
Insuffisance cardiaque	43 (17)	35 (18)	8 (12)	0,258
Maladie coronarienne	109 (42)	78 (41)	31 (46)	0,474
Antécédent infarctus du myocarde	22 (9)	19 (11)	3 (4)	0,210
Antécédent AVC	42 (17)	28 (16)	14 (21)	0,251
EuroSCORE II	3,75 (2,31 – 6,70)	3,95 (2,58 – 7,47)	3,29 (2,03 – 5,74)	0,458
Score STS	4,28 (3,11 – 6,07)	4,27 (3,16 – 6,01)	4,44 (3,08 – 7,24)	0,938
Score CHA2DS2-VASc	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	0,940

Paramètres biologiques juste avant la procédure TAVI				
Leucocytes (G/L)	6,5 (5,2 – 8,0)	6,6 (5,2 – 8,0)	6,2 (5,4 – 7,9)	0,542
Neutrophiles (G/L)	4,3 (3,4 – 5,5)	4,3 (3,4 – 5,4)	4,0 (3,3 – 5,7)	0,640
Lymphocytes (G/L)	1,3 (0,9 – 1,7)	1,3 (0,9 – 1,6)	1,3 (0,9 – 1,7)	0,936
Monocytes (G/L)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,6 (0,4 – 0,8)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,493
Plaquettes (G/L)	220 (170 – 268)	223 (176 – 269)	209 (169 – 255)	0,259
CRP (mg/L)	1 (1 – 7)	1 (1 – 6)	3 (1 – 8)	0,217
VWF:Ag (UI/dL)	173 (132 – 224)	170 (132 – 224)	180 (133 – 231)	0,721
Ratio VWF:CB/VWF:Ag	0,74 (0,64 – 0,85)	0,74 (0,63 – 0,83)	0,75 (0,65 – 0,86)	0,792

Au moins une mutation CHIP a été identifiée chez 191 patients (74% de la cohorte totale) avec une VAF $\geq 1\%$, seuil de sensibilité de la technique (ils seront nommés CHIP-positif). Aucun variant n'a été identifié chez seulement 67 patients (CHIP-négatif, 26% de la cohorte). L'âge médian des patients CHIP-positif était significativement plus élevé que les patients CHIP-négatif ($p=0,036$). Il n'y avait pas de différence significative de prévalence entre les hommes et les femmes, ni de différence pour aucun des paramètres cliniques et biologiques entre les patients CHIP-positif et CHIP-négatif. Comme décrit précédemment dans la littérature [146], la prévalence de la CHIP augmentait avec l'âge dans notre cohorte de patients avec SVA sévère, avec une prévalence respectivement de 50, 71, 78 et 79% chez les patients ≤ 69 ans, de 70 à 79 ans, de 80 à 89 ans et ≥ 90 ans (figure 15).

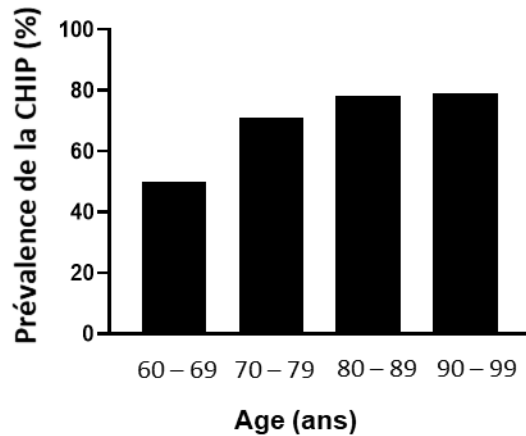


Figure 15 : Prévalence de la CHIP en fonction de l'âge des patients inclus dans l'étude.

Grande diversité de mutations CHIP chez les patients avec SVA

Un total de 409 variants dans 35 gènes a été identifié chez 191 patients. Le spectre mutationnel complet de CHIP est décrit figure 16. Les gènes les plus fréquemment mutés étaient *DNMT3A* et *TET2*, avec respectivement 31% et 28% des variants identifiés.

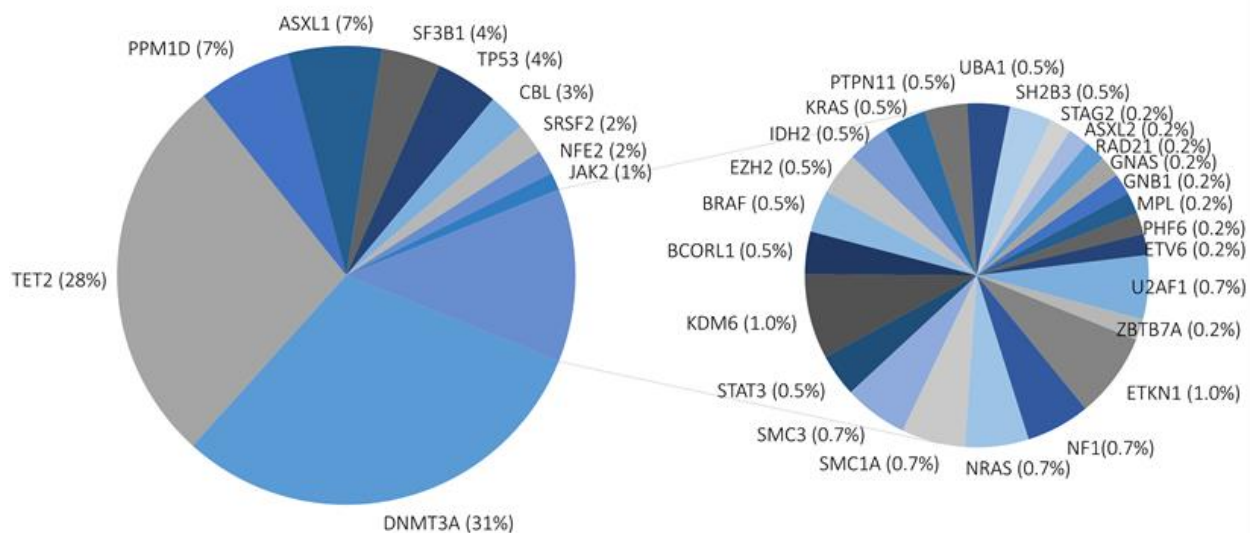


Figure 16 : Proportion des mutations identifiées au total (191 patients CHIP-positive, 409 mutations)

Quatre-vingt-quinze patients présentaient un ou plusieurs variants dans *DNMT3A* et 80 patients dans *TET2*, incluant 25 patients avec des variants dans ces 2 gènes. D'autres gènes mutés de manière récurrente ont été identifiés comme *PPM1D* (n=23 patients, 7% des variants totaux), *ASXL1* (n=23, 7%), *TP53* (n=16, 4%), *SF3B1* (n=15, 4%), *CBL* (n=9, 3%), *SRSF2* (n=9, 2%) et *NFE2* (n=7, 2%) (figure 17). Le variant V617F dans *JAK2* a été identifié chez 5 patients. La VAF médiane était de 3% (1 – 7) (figure 18).

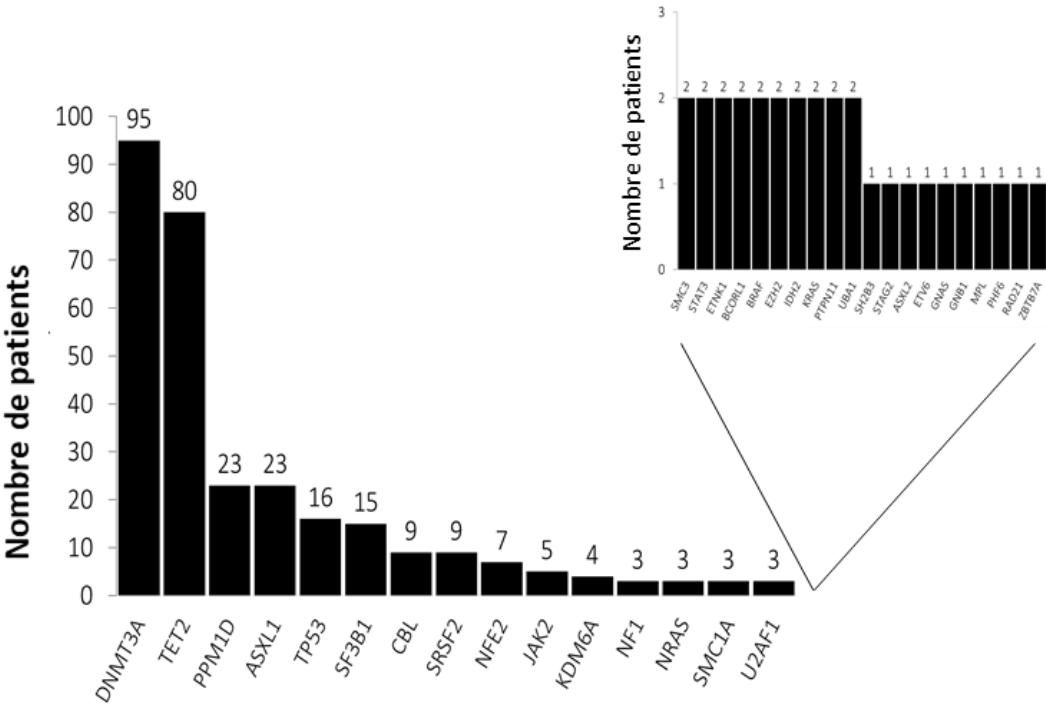
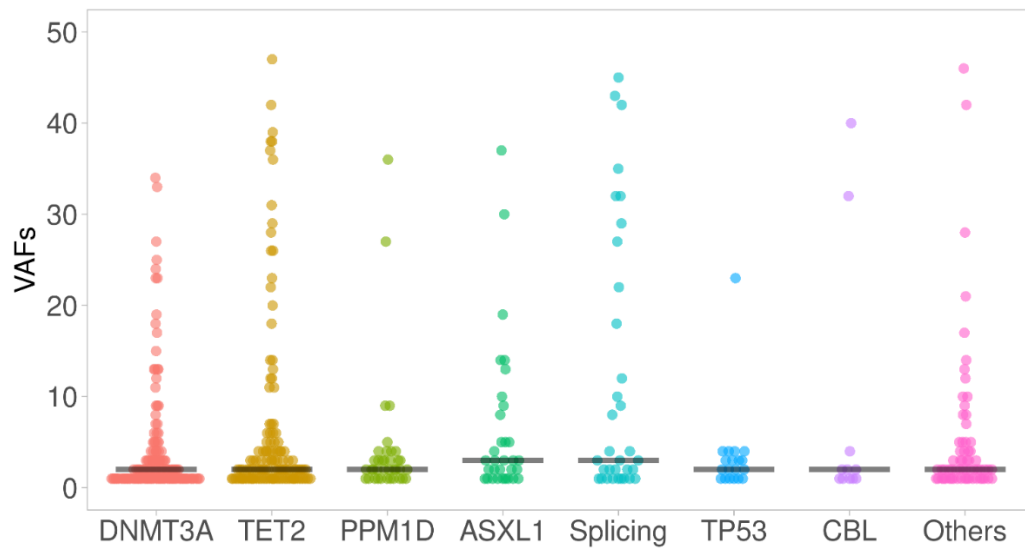


Figure 17 : Nombre de patients présentant une ou plusieurs mutations par gène identifié



	DNMT3A	TET2	PPM1D	ASXL1	Epissage	TP53	CBL	Autres	Total
Min	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Max	73	75	36	37	45	23	40	46	75
Médiane	3	3	3	4	4	3	3	3	3

Figure 18 : Litter plot de la VAF pour chaque mutation CHIP. La VAF médiane est représentée par la ligne horizontale. Trois valeurs ne sont pas montrées sur le graphe car la VAF était supérieure à 50% (1 *DNMT3A*, VAF 73% et 2 *TET2*: VAF 64% et 75%)

La figure 19 illustre le paysage moléculaire de la cohorte avec la représentation des co-variants chez les 191 patients CHIP-positifs.

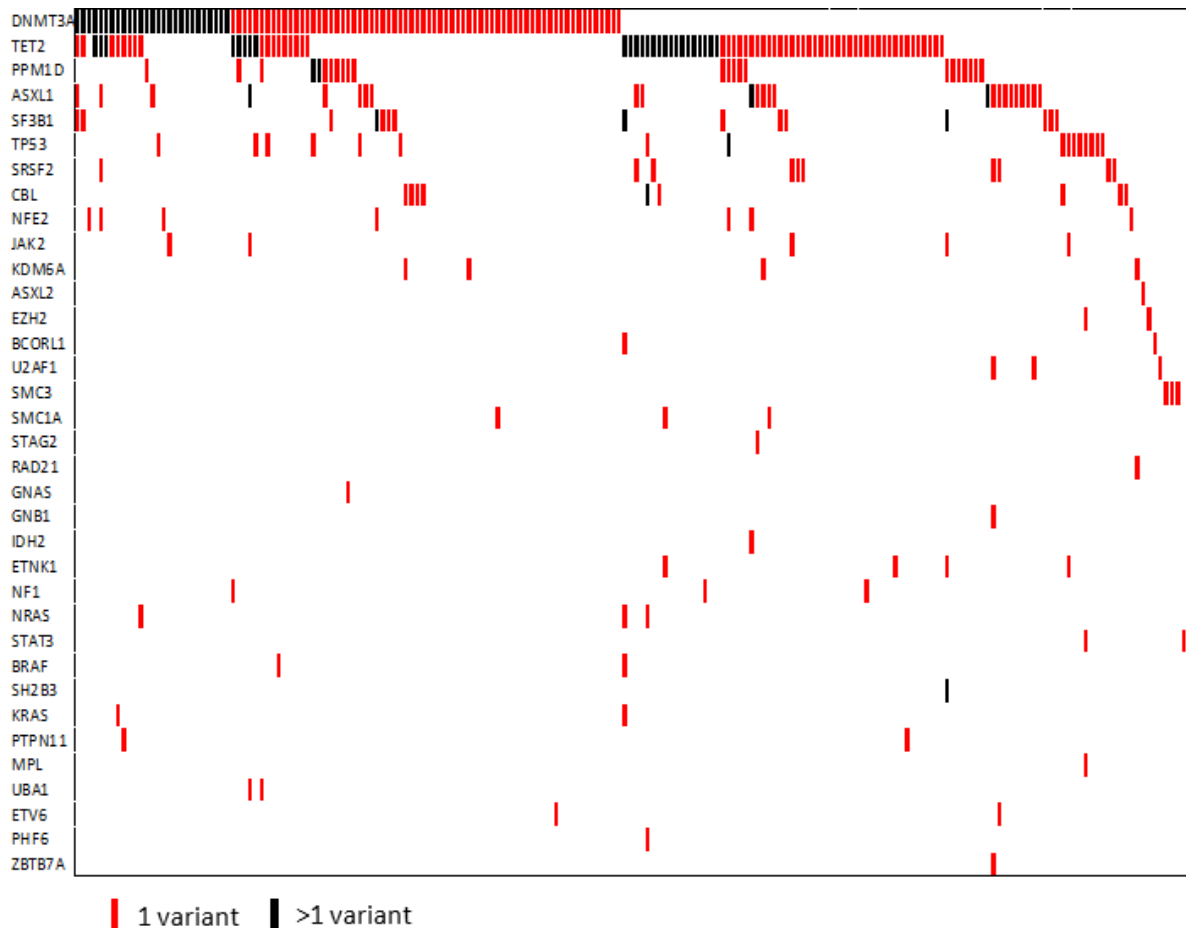


Figure 19 : Paysage moléculaire représentant les co-variants chez les 191 patients CHIP-positifs. Les rectangles noirs indiquent plusieurs mutations dans le même gène. Le nombre de mutations identifiées dans chaque gène est : *DNMT3A*=125, *TET2*=113, *PPM1D*=27, *ASXL1*=27, épissage=30, *TP53*=17, *CBL*=11, autres=59. Les gènes d'épissage incluent *SF3B1*, *SRSF2* et *U2AF1*.

Quatre-vingt-quatre patients (45%) présentaient seulement un variant de CHIP et 170 patients présentaient 2 à 10 variants. Seize patients présentaient une VAF très élevée (>30%) mais ne présentaient pas de maladie hématologique maligne. Chez les patients CHIP-positifs, le nombre de variants identifiés par patient ainsi que la VAF ne variaient pas en fonction de l'âge. Parmi les 409 mutations identifiées, 272 étaient des substitutions nucléotidiques, principalement des transitions (62%) plutôt que des transversions (38%), et en majorité il s'agissait de transition C en T précédemment décrite comme une signature mutationnelle

caractéristique de l'âge, prédominante dans l'hématopoïèse clonale [147,156,157,181,182] (figure 20).

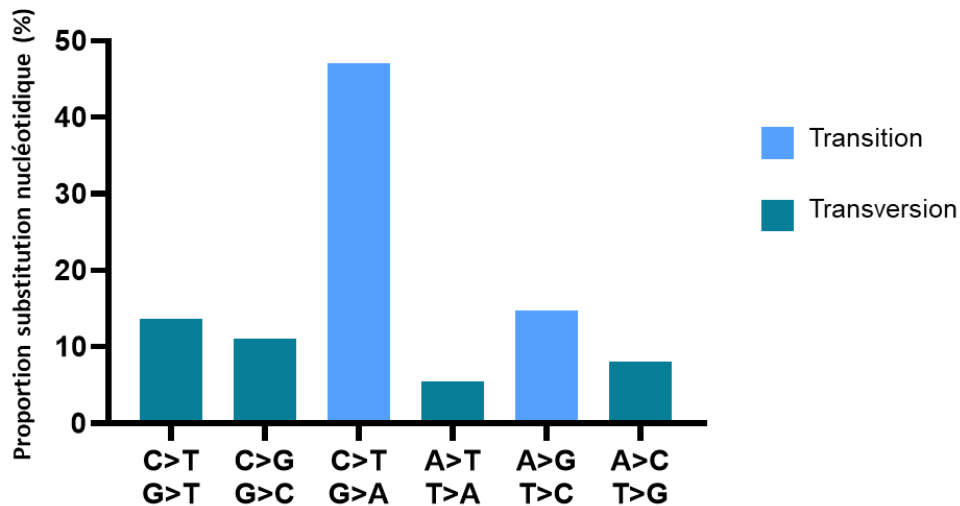


Figure 20 : Distribution des types de substitutions nucléotidiques observées dans la cohorte.

Mauvais pronostic pour les patients présentant une mutation dans TET2

Les patients ont été suivis sur une durée de 5 ans après leur TAVI. La médiane de suivi était de 4,0 ans (IQR 2,7 – 5,0). À 5 ans, 95 patients étaient décédés (37%) incluant 71 patients CHIP-positif et 24 CHIP-négatif. L'incidence de la mortalité des patients en fonction des gènes mutés est présentée figure 21.

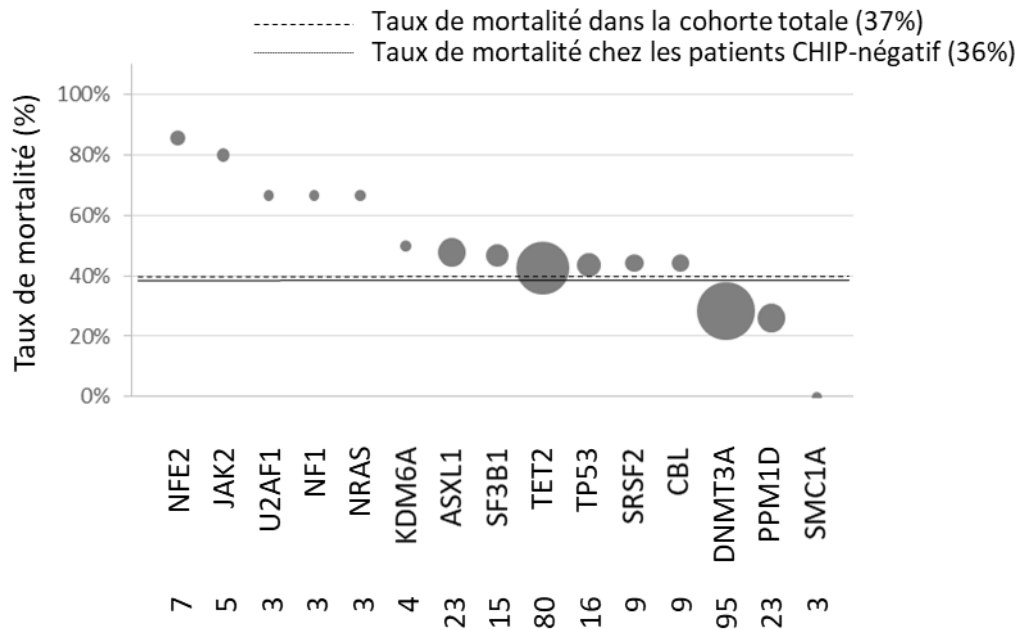
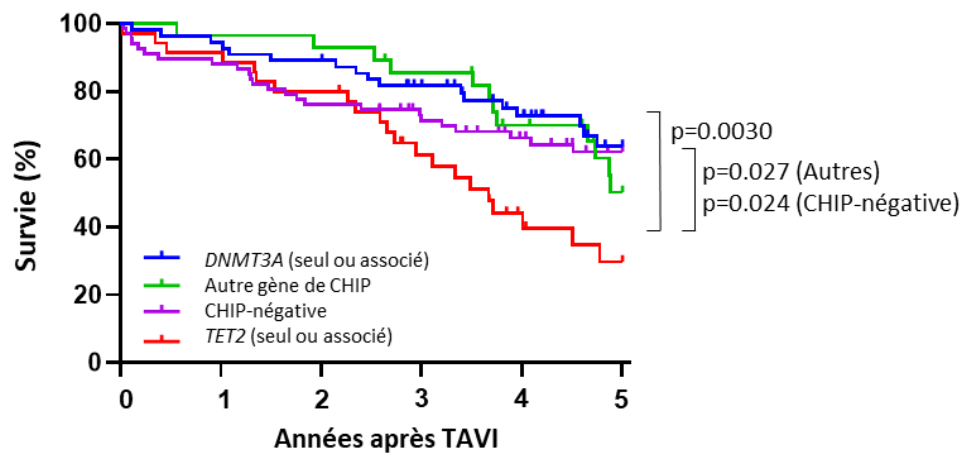


Figure 21 : Incidence de la mortalité chez les patients CHIP-positive en fonction des gènes mutés. La taille de la bulle représente le nombre de patients mutés pour le gène correspondant sur l'axe horizontal (aussi donné en valeur absolue). Les gènes pour lesquels moins de 3 patients étaient mutés ont été exclus.

Pour la suite des analyses, nous avons décidé d'étudier le retentissement spécifique de *DNMT3A* et *TET2* en les analysant séparément. Nous avons donc exclu les patients présentant concomitamment un variant dans ces 2 gènes (n=25). Nous avons aussi exclu les patients avec une VAF élevée (>10%, n=35) dans le but de se concentrer sur l'impact des VAF faibles. Notre cohorte pour l'analyse de survie comprenait ainsi 185 patients (39% d'hommes) dont 74 sont décédés dans les 5 ans après le TAVI.

Nous avons séparé les patients CHIP-positive en différents groupes selon les gènes mutés : *DNMT3A* seul ou en association avec un autre gène (hors *TET2*, n=55), *TET2* seul ou en association avec un autre gène (hors *DNMT3A*, n=35), autre gène de CHIP (n=28) et CHIP-négative (n=67). L'analyse de survie Kaplan-Meier (figure 22) a montré que la survie globale à

5 ans était significativement plus basse chez les patients présentant une mutation dans *TET2*, seule ou en association avec une mutation dans un autre gène (hormis *DNMT3A*) en comparaison avec les patients porteurs d'une mutation dans *DNMT3A* (Hazard Ratio (HR) : 0.40 [95% CI : 0.20-0.78], $p=0,0030$), dans un autre gène de CHIP (HR : 0.46 [95% CI: 0.23-0.92], $p=0,027$) et avec les patients CHIP-négative (HR : 0.52 [95% CI: 0.58-0.97], $p=0,024$).



<i>DNMT3A</i>	55	53	50	42	32	20
Autre gène de CHIP	28	28	27	24	18	10
CHIP-négative	67	60	52	45	36	27
<i>TET2</i>	35	33	29	19	11	6

Figure 22 : Analyse de survie Kaplan-Meier des patients avec SVA sévère durant 5 années de suivi après le TAVI, les sous-groupes dépendant du gène muté. Les patients présentant concomitamment une mutation dans *DNMT3A* et *TET2* étaient exclus, ainsi que les patients avec une VAF >10%.

Il n'y avait pas de différence significative au niveau des paramètres biologiques incluant les leucocytes, les neutrophiles, les lymphocytes, les monocytes, la CRP, le VWF:Ag et le ratio VWF:CB/VWF:Ag entre les 4 groupes de patients avant TAVI, ni de différence au niveau des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α dosées dans des échantillons représentatifs des 4 groupes de patients (figures 23 et 24).

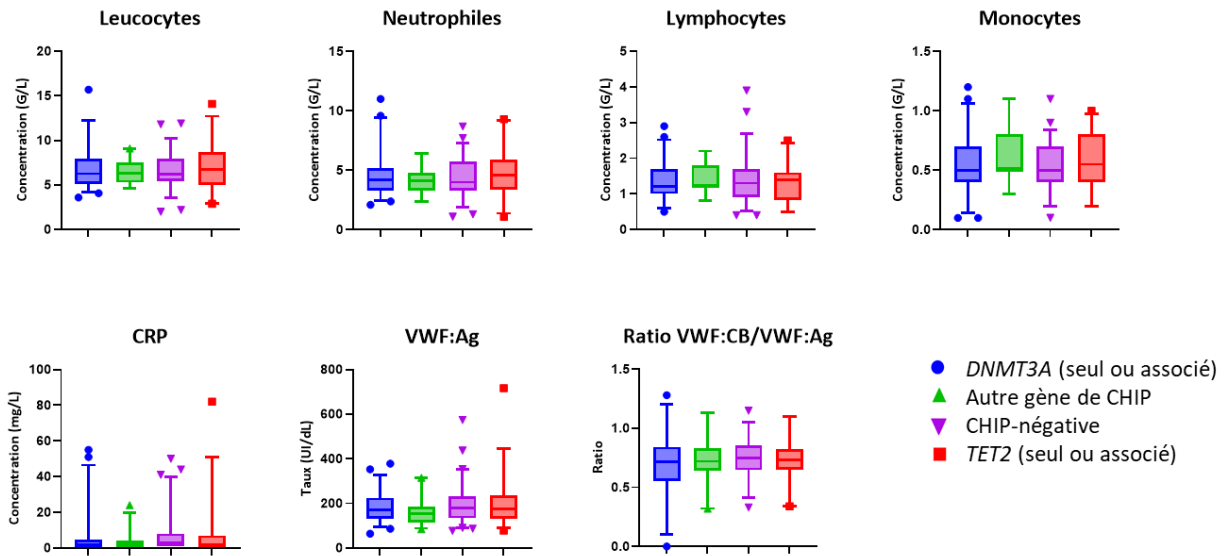


Figure 23 : Paramètres biologiques dosés avant TAVI selon le gène muté en CHIP.

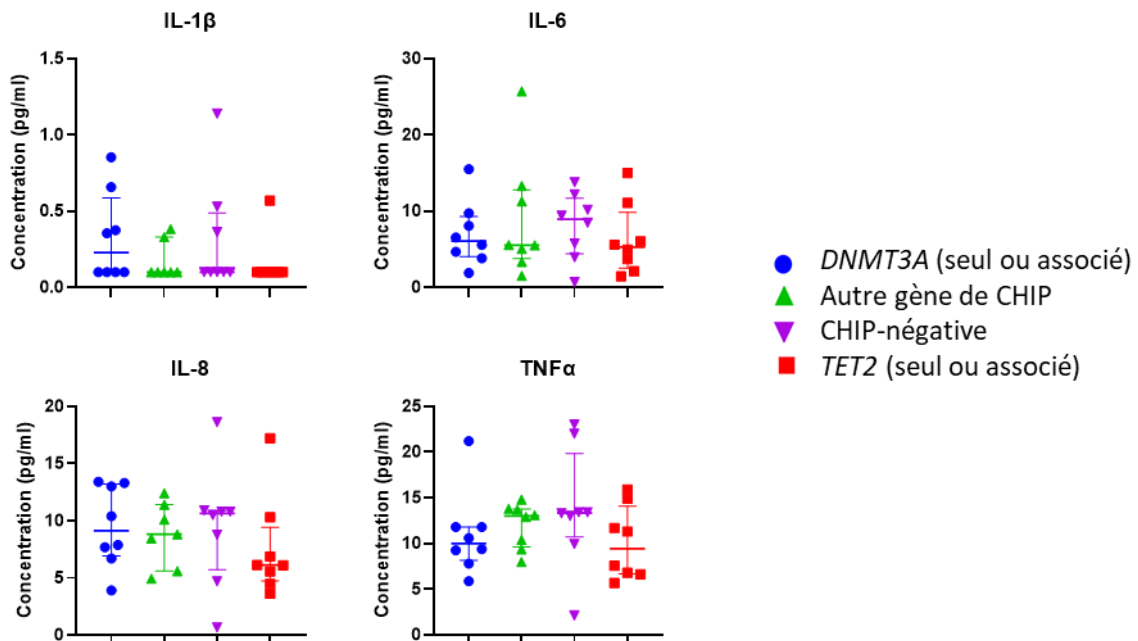
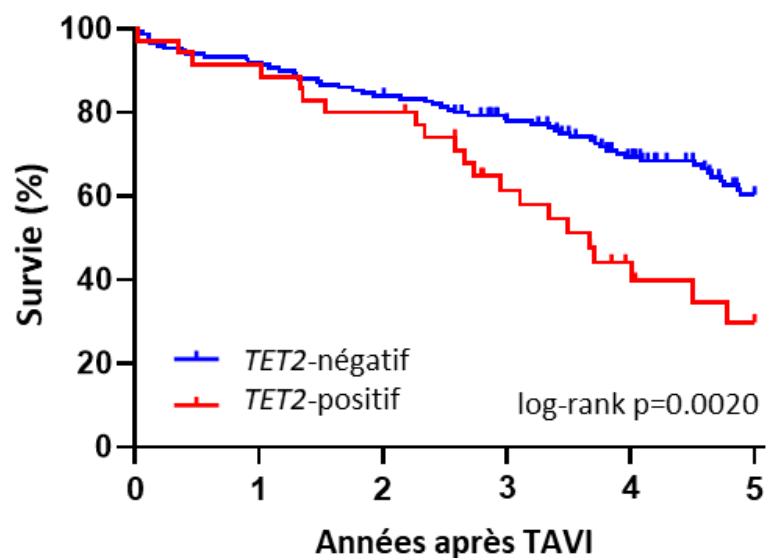


Figure 24 : Concentration des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α avant TAVI entre les 4 groupes de patients (n=8 pour chaque groupe)

TET2 semblant être le gène à l'impact le plus péjoratif, nous avons ensuite comparé la survie globale entre les patients *TET2*-positif (n=35) et tous les patients *TET2*-négatif (incluant les patients *DNMT3A*, autre gène de CHIP et CHIP-négative, n=150), et nous avons observé que les patients *TET2*-positif avaient une survie globale significativement plus basse que les patients *TET2*-négatif (HR : 0.46 [95% CI: 0.25-0.87], p=0,020) (figure 25). Les patients *TET2*-positif n'étaient pas plus âgés que les *TET2*-négatif et leur VAF n'était pas non plus plus élevée. Il n'y avait pas non plus de différence significative au niveau des paramètres cliniques et biologiques entre les 2 groupes (tableau XII).



<i>TET2</i> -négatif	150	138	127	109	84	57
<i>TET2</i> -positif	35	33	29	19	11	6

Figure 25 : Analyse de survie Kaplan-Meier des patients avec SVA sévère durant 5 années de suivi après le TAVI, selon la présence d'une mutation dans *TET2*. Les patients présentant concomitamment une mutation dans *DNMT3A* et *TET2* étaient exclus du groupe « *TET2*-positif », ainsi que les patients avec une VAF >10%.

Tableau XII : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients *TET2*-positif et *TET2*-négatif. Les patients présentant concomitamment une mutation dans *DNMT3A* et *TET2* étaient exclus du groupe « *TET2*-positif », ainsi que les patients avec une VAF >10% de la cohorte totale. Les variables continues sont exprimées en médiane (interquartiles) et les variables catégorielles en fréquences (pourcentage). AVC : accident vasculaire cérébral, CHIP : hématoïèse clonale de signification indéterminée, CRP : protéine C réactive, IMC : indice de masse corporelle, VWF : facteur von Willebrand

Caractéristiques	Total patients	<i>TET2</i> -positif	<i>TET2</i> -négatif	p-value patients <i>TET2</i> -positif vs <i>TET2</i> -négatif
Nombre de patients	185	35	150	
Sexe (hommes)	72 (39%)	15 (43%)	57 (38%)	0,701
Age médian, années	84 (79 – 87)	85 (81 – 88)	84 (78 – 86)	0,152
• ≤ 69 ans	12 (6)	1 (3)	11 (7)	0,443
• 70 – 79 ans	40 (22)	5 (15)	35 (24)	
• 80 – 89 ans	114 (62)	25 (71)	89 (59)	
• ≥ 90 ans	19 (10)	4 (11)	15 (10)	
Comorbidités et facteurs de risque cardiovasculaire				
IMC (kg/m ²)	26,8 (23,3 – 30,3)	26,4 (21,5 – 32,8)	26,9 (23,5 – 30,1)	0,845
Tabac	20 (11)	4 (11)	16 (11)	>0,999
Diabète	56 (30)	12 (34)	44 (29)	0,199
Hypertension artérielle	138 (74)	23 (66)	115 (77)	0,226
Dyslipidémie	90 (48)	15 (43)	75 (50)	0,460
Fibrillation auriculaire	61 (33)	13 (37)	48 (32)	0,556
Insuffisance rénale	75 (41)	14 (40)	61 (41)	>0,999
Insuffisance cardiaque	26 (14)	8 (23)	18 (12)	0,108
Maladie coronarienne	77 (42)	17 (49)	60 (40)	0,447
Antécédent infarctus du myocarde	14 (8)	4 (11)	10 (7)	0,307
Antécédent AVC	32 (17)	4 (11)	28 (19)	0,456
EuroSCORE II	3,82 (2,10 – 6,70)	4,48 (3,04 – 9,45)	3,75 (2,04 -3,67)	0,194
Score STS	4,05 (3,08 – 6,14)	4,05 (2,66 – 7,59)	4,04 (3,10 – 6,06)	0,731
Score CHA2DS2-VASc	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	0,985
Paramètres biologiques juste avant la procédure TAVI				
Leucocytes (G/L)	6,4 (5,3 – 7,9)	6,8 (5,0 – 8,7)	6,2 (5,3 – 7,8)	0,413
Neutrophiles (G/L)	4,2 (3,3 – 5,4)	4,6 (3,4 – 5,9)	4,1 (3,3 – 5,2)	0,371

Lymphocytes (G/L)	1,3 (1,0 – 1,7)	1,4 (0,8 – 1,6)	1,3 (1,0 – 1,7)	0,997
Monocytes (G/L)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,6 (0,4 – 0,8)	0,5 (0,4 – 0,7)	0,929
Plaquettes (G/L)	221 (171 – 266)	230 (195 – 259)	219 (169 – 268)	0,564
CRP (mg/L)	1 (1 – 6)	1 (1 – 7)	1 (1 – 6)	0,860
VWF:Ag (UI/dL)	160 (128 – 194)	160 (127 – 231)	161 (128 – 191)	0,780
Ratio VWF:CB/VWF:Ag	0,73 (0,63 – 0,84)	0,73 (0,65 – 0,82)	0,74 (0,61 – 0,85)	0,810

Comme illustré dans le tableau XII et la figure 26, il n’y avait pas de différence significative au niveau des paramètres inflammatoires incluant les concentrations circulantes de CRP, leucocytes, neutrophiles, monocytes, du VWF ainsi que d’IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α entre les patients *TET2*-positif et *TET2*-négatif.

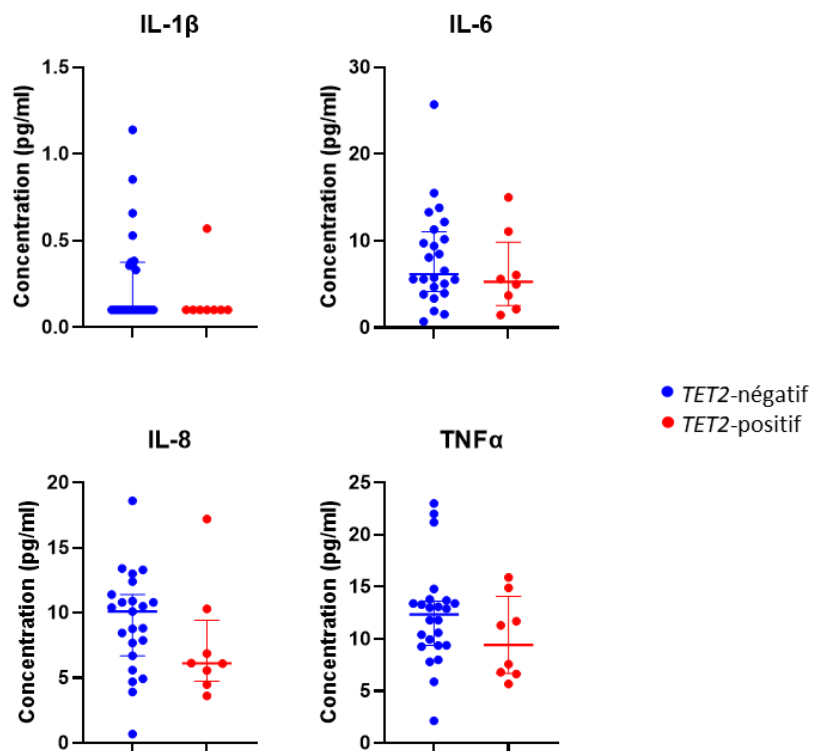


Figure 26 : Concentration des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α avant TAVI entre les patients *TET2*-positif (n=8) et *TET2*-négatif (n=24).

La présence d'une mutation *TET2* restait indépendamment associée avec une survie plus basse après analyse multivariée par régression Cox ($p=0,027$, tableau XIII) incluant l'âge, le sexe, les antécédents d'insuffisance rénale, d'insuffisance cardiaque et de fibrillation auriculaire.

Tableau XIII: Analyse multivariée de la survie globale 5 ans après TAVI par régression Cox

Variable	p-value	Hazard ratio	95% IC
Présence <i>TET2</i>	0,027	0,611	0,395 – 0,945
Age	0,092	1,024	0,996 – 1,053
Sexe	0,849	0,966	0,672 – 1,386
Insuffisance rénale	0,621	0,908	0,619 – 1,332
Insuffisance cardiaque	0,997	1,001	0,587 – 1,706
Fibrillation auriculaire	0,458	1,146	0,799 – 1,644

Discussion

Notre travail est le premier qui a étudié le profil mutationnel complet de CHIP dans une cohorte de patients avec SVA sévère et bénéficiant d'un TAVI. Nous avons montré que les variants somatiques déterminants de l'hématopoïèse clonale sont très fréquents dans la SVA, avec une prévalence de 74% de patients CHIP-positifs dans notre cohorte de 258 patients. Ce pourcentage est beaucoup plus élevé que dans la population générale [146,183]. Nous avons identifié 409 variants dans 35 gènes hématopoïétiques au total. Tout comme dans les précédentes études, les gènes *DNMT3A* et *TET2* étaient les plus fréquemment mutés dans notre cohorte, et la prévalence de la CHIP augmentait avec l'âge. Nous avons montré que

d'autres gènes étaient également mutés dans notre cohorte de patients présentant une SVA sévère, comme *PPM1D*, *ASXL1*, *TP53*, *SF3B1*, *CBL*, *SRSF2*, *NFE2* et *JAK2*. Même si la majorité des études utilise un seuil de VAF à 2% pour définir la CHIP [167,184], ce seuil est arbitraire et toujours discuté, notamment, d'une part, en raison de l'évolution de la sensibilité de détection des techniques de biologie moléculaire mises en œuvre [185] et d'autre part, parce que des données récentes montrent que même des mutations de CHIP à très faible VAF (0,05% – 2%) pouvaient avoir un impact clinique [156]. De plus, avec notre technique, la VAF mesurée d'un variant avec une VAF attendue de 2% peut varier entre 1,1 et 2,9%. Même en se focalisant seulement sur les gènes *DNMT3A* et *TET2*, nous obtenons un pourcentage de patients CHIP-positifs plus élevé que dans la cohorte de Mas-Peiro *et al.*, avec 150 patients positifs sur 258 (58,6%) contre 33,3% dans leur cohorte. Enfin, si nous utilisons un seuil strict théorique de VAF $\geq 2\%$, nous avons encore 120 patients *DNMT3A* et/ou *TET2* positifs (45,6%).

Alors que la plupart des études regroupent les patients porteurs d'une mutation dans *DNMT3A* et *TET2* pour évaluer le pronostic, nous avons choisi d'étudier séparément leur association avec la mortalité. En effet, ces 2 gènes et leurs variants entraînant une perte de fonction ont des effets divergents sur les CSH [180], la méthylation de l'ADN et les voies inflammatoires [18], ils devraient donc être considérés séparément. Nous avons observé que les patients présentant une mutation *TET2* à faible VAF ($\leq 10\%$) avaient un moins bon pronostic avec une survie globale significativement plus basse à 5 ans après TAVI alors que la présence d'une mutation dans *DNMT3A* n'est pas associée avec un mauvais pronostic post-TAVI. Ce n'est pas la première étude qui observe un impact plus faible de *DNMT3A* par rapport à *TET2* dans les maladies cardiovasculaires. Dans leur méta-analyse de 5 cohortes incluant 56 597 patients avec une défaillance cardiaque, Yu *et al.* ont montré que les gènes *ASXL1*, *TET2* et

JAK2 étaient chacun associés à un risque augmenté de défaillance cardiaque jusqu'à 20 ans de suivi, alors que *DNMT3A* ne l'était pas [186].

TET2 est une enzyme clé qui catalyse la déméthylation des méthylcytosines de l'ADN. Plusieurs études ont montré qu'une délétion de *TET2* dans des modèles murins entraînait une inflammation accrue, particulièrement une augmentation de sécrétion par les macrophages d'IL-1 β médiée par l'inflammasome NLRP3 et d'IL-6 [164,187]. La SVA résulte d'un processus inflammatoire actif dont les mécanismes sont proches de l'athérosclérose et l'IL-1 β a un rôle prédominant dans la calcification valvulaire en favorisant la prolifération des cellules interstitielles de valve de type myofibroblastique et leur expression de métalloprotéinases de matrice [188].

Notre étude appuie la théorie que l'IL-1 β et l'inflammasome pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques dans la SVA et dans l'amélioration de la survie après TAVI chez les patients qui portent une mutation somatique de *TET2*. L'étude clinique Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS) a prouvé l'efficacité du canakinumab, un anticorps monoclonal qui inhibe IL-1 β , en réduisant le risque d'événements cardiovasculaires chez les patients présentant des marqueurs d'inflammation élevés [131,132]. La colchicine a aussi prouvé son efficacité en entraînant un risque significativement diminué d'événements ischémiques cardiovasculaires chez les patients avec un antécédent d'infarctus du myocarde [189]. Finalement, une très récente étude a montré que le blocage de l'inflammasome NLRP3 réduisait la calcification et la sténose de la valve aortique en prévenant la modulation des macrophages vers le phénotype M1 et en régulant négativement l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-6 [190].

Mas-Peiro a aussi observé dans son étude que les patients avec SVA sévère et porteurs d'un variant *TET2* avaient des concentrations circulantes de monocytes non classiques augmentées. Ces derniers sécrétant de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires [168], ces données appuient la théorie que l'inflammation joue un rôle critique dans le pronostic du TAVI [191]. Les résultats de cette étude sont renforcés par une autre étude du même groupe qui a observé, grâce à une analyse d'ARN des monocytes en single-cell une expression augmentée des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , du récepteur de l'IL-6, de l'inflammasome NLRP3 et de CD163, un récepteur impliqué dans le syndrome d'activation macrophagique, dans les monocytes circulants de 8 patients avec SVA sévère et mutés *DNMT3A* ou *TET2*, par rapport à une population contrôle du même âge et sans mutation [155]. Cette étude n'a pas différencié les 2 gènes *DNMT3A* ou *TET2*. Cependant, dans notre étude, nous n'avons retrouvé aucune différence significative au niveau des concentrations circulantes des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α entre les patients *TET2*-positifs et *TET2*-négatifs. Des études fonctionnelles dans des modèles précliniques pertinents sont encore nécessaires pour comprendre comment des mutations de CHIP peuvent contribuer au développement de la SVA et impacter le pronostic après TAVI, tout particulièrement *TET2*. Nos résultats doivent être validés dans des cohortes plus larges de patients consécutifs avant d'être utilisés pour la prise de décision dans la prise en charge des patients avec SVA sévère bénéficiant d'un TAVI.

En conclusion, nous avons montré que la SVA était associée à une prévalence élevée de CHIP avec un large spectre mutationnel, dont les gènes touchés les plus fréquents sont *DNMT3A* et *TET2* mais nous avons également identifié des mutations dans 33 autres gènes myéloïdes. Ces résultats concordent avec la littérature qui définit la CHIP comme un nouveau

facteur de risque lié à l'âge des maladies cardiovasculaires. Les variants somatiques de *TET2* sont les plus associés avec une surmortalité à long terme après TAVI en comparaison avec les autres gènes, y compris *DNMT3A*. Ce résultat pourrait apporter un nouvel outil d'évaluation du pronostic du patient après TAVI dans le contexte de SVA sévère.

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Le remplacement valvulaire, par voie chirurgicale ou percutanée, reste à ce jour l'unique prise en charge de la SVA, pathologie valvulaire la plus fréquente chez le sujet âgé. Le TAVI s'est imposé ces dernières années comme technique de référence pour les patients à haut risque chirurgical, avec un élargissement récent des indications pour les patients à risque faible et intermédiaire. Cependant, malgré une amélioration significative du pronostic des patients, le TAVI reste associé à la survenue de complications thrombotiques et hémorragiques post-procédurales qui impactent la morbi-mortalité des patients à court ou long terme et dont les mécanismes sont encore très peu décrits. Pour essayer de mieux les comprendre, nous avons étudié l'impact des processus inflammatoires qui peuvent survenir lors du TAVI. En effet, lors de la procédure, la restauration de la pulsativité du flux sanguin et la réduction des forces de cisaillements élevées, conséquences hémodynamiques de la SVA, sont instantanées. L'impact de ces modifications brutales sur les cellules sanguines circulantes n'avait encore jamais été étudié. Nous avons aussi étudié le profil mutationnel de CHIP des patients atteints de SVA, celle-ci étant décrite depuis quelques années comme un nouveau facteur de risque lié à l'âge des maladies cardiovasculaires, mais dont le rôle a été encore très peu étudié dans la SVA. *DNMT3A* et *TET2*, les gènes les plus fréquemment mutés en CHIP, auraient un rôle dans la régulation du phénotype inflammatoire des monocytes.

Dans la première partie de notre travail, nous avons étudié l'impact du TAVI sur les monocytes circulants. Pour cela, nous avons observé l'évolution des concentrations circulantes des différentes sous-populations monocytaires et celle du transcriptome des monocytes avant et après TAVI chez une cohorte de 37 patients avec SVA sévère. Nous avons

pu observer que le TAVI entraînait à J1 une augmentation des concentrations circulantes de monocytes totaux, avec une augmentation des monocytes classiques et intermédiaires par rapport aux concentrations basales avant la procédure. En accord avec les quelques données présentes dans la littérature, nous avons montré que les monocytes intermédiaires semblent être le plus associés avec un pronostic péjoratif pour les patients, notamment avec la mortalité à 1 an et 3 ans. Nous avons aussi montré que le TAVI avait un impact sur le transcriptome des monocytes classiques avec une surexpression à J1 des gènes impliqués dans les fonctions monocytaires telles que la réponse inflammatoire, l'activation macrophagique et la phagocytose. La thrombomoduline, récepteur de la thrombine à effet anticoagulant et anti-inflammatoire, pourrait avoir un rôle protecteur dans le développement de ces complications.

Dans la deuxième partie de notre travail, nous avons établi le profil complet de CHIP avant TAVI et évalué l'association de la CHIP avec la mortalité à long terme après TAVI. Une seule étude s'était pour le moment intéressée à la CHIP dans le contexte de SVA et TAVI et avait décrit la présence d'au moins une CHIP dans les gènes *DNMT3A* et/ou *TET2* chez un tiers de leur cohorte de 279 patients ainsi qu'un risque accru de mortalité à 8 mois après TAVI chez les patients porteurs de CHIP. En étudiant le profil mutationnel complet de nos 258 patients, nous avons montré que la SVA était très fortement associée à la présence d'une CHIP avec 74% de notre cohorte mutée sur un large spectre mutationnel de 409 variants dans 35 gènes différents. La mortalité toute cause dans les 5 ans après TAVI était de 37% dans notre étude, ce qui est inférieur à celle de 46% retrouvée dans la littérature [68]. Nous avons observé que les patients porteurs d'un variant somatique dans le gène *TET2* avaient un moins bon pronostic avec une survie globale significativement plus basse à 5 ans après TAVI comparée aux patients porteurs d'une CHIP dans un autre gène et aux patients négatifs en CHIP et ceci

indépendamment de l'âge, du sexe, des antécédents d'insuffisance rénale, d'insuffisance cardiaque et de fibrillation auriculaire.

Même s'il est décrit que *TET2* semble réguler le phénotype inflammatoire des monocytes [161,163,164], son impact péjoratif dans notre étude n'est peut-être pas uniquement lié à l'inflammation car nous n'avons pas retrouvé de différence de concentrations circulantes des cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF α entre les patients *TET2*-positifs et *TET2*-négatifs. La perspective majeure de notre travail serait ainsi d'étudier le transcriptome des monocytes entre des patients *TET2*-positifs et *TET2*-négatifs afin de pouvoir mettre en évidence les différences d'expression relatives aux mutations de ce gène.

Les résultats obtenus dans cette thèse sont importants car ils ont permis de montrer que le TAVI a un impact sur les monocytes circulants et module leur phénotype hémostatique et inflammatoire, ce qui pourrait avoir des conséquences sur la survenue des complications hémorragiques et thrombotiques post-procédurales. La suite de ce travail pourrait permettre de mettre en évidence de nouveaux marqueurs pronostiques et d'améliorer la prise en charge des patients avec SVA sévère et bénéficiant d'un TAVI.

BIBLIOGRAPHIE

1. Goody PR, Hosen MR, Christmann D, Niepmann ST, Zietzer A, Adam M, et al. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40:885-900.
2. Passos LSA, Lupieri A, Becker-Greene D, Aikawa E. Innate and adaptive immunity in cardiovascular calcification. *Atherosclerosis* 2020;306:59-67.
3. Grim JC, Aguado BA, Vogt BJ, Batan D, Andrichik CL, Schroeder ME, et al. Secreted Factors From Proinflammatory Macrophages Promote an Osteoblast-Like Phenotype in Valvular Interstitial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40:e296-308.
4. Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, Gown AM, O'Brien KD. Characterization of the early lesion of « degenerative » valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994;90:844-53.
5. Freeman RV, Otto CM. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation* 2005;111:3316-26.
6. Zebhi B, Lazkani M, Bark D. Calcific Aortic Stenosis—A Review on Acquired Mechanisms of the Disease and Treatments. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:734175.
7. Bian W, Wang Z, Sun C, Zhang DM. Pathogenesis and Molecular Immune Mechanism of Calcified Aortic Valve Disease. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:765419.
8. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, Milojevic M, Baldus S, Bauersachs J, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J* 2022;43:561-632.
9. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, Carabello BA, Erwin JP, Gentile F, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. *J Am Coll Cardiol* 2021;77:450-500.
10. Rouleau SG, Brady WJ, Koyfman A, Long B. Transcatheter aortic valve replacement complications: A narrative review for emergency clinicians. *Am J Emerg Med* 2022;56:77-86.
11. Pieniak K, Jędrzejczyk S, Domaszko O, Grodecki K, Rymuza B, Huczek Z, et al. Predictors and Biomarkers of Subclinical Leaflet Thrombosis after Transcatheter Aortic Valve Implantation. *J Clin Med* 2020;9:3742.
12. Williams H, Mack CD, Li SCH, Fletcher JP, Medbury HJ. Nature versus Number: Monocytes in Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci* 2021;22:9119.
13. van der Vorst EPC, Weber C. Novel Features of Monocytes and Macrophages in Cardiovascular Biology and Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019;39:e30-7.

14. Ożańska A, Szymczak D, Rybka J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand J Immunol* 2020;92:e12883.
15. Idzkowska E, Eljaszewicz A, Miklasz P, Musiał WJ, Tycinska AM, Moniuszko M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand J Immunol* 2015;82:163-73.
16. Amancherla K, Wells JA, Bick AG. Clonal hematopoiesis and vascular disease. *Semin Immunopathol* 2022;44:303-8.
17. Heimlich JB, Bick AG. Somatic Mutations in Cardiovascular Disease. *Circ Res* 2022;130:149-61.
18. Cobo I, Tanaka T, Glass CK, Yeang C. Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Hematol* 2022;29:1-7.
19. Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical Factors Associated With Calcific Aortic Valve Disease. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:630-4.
20. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, Iung B, Lancellotti P, Otto CM, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2:16006.
21. Latif N, Sarathchandra P, Taylor PM, Antoniow J, Yacoub MH. Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves. *J Heart Valve Dis* 2005;14:218-27.
22. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The Emerging Role of Valve Interstitial Cell Phenotypes in Regulating Heart Valve Pathobiology. *Am J Pathol* 2007;171:1407-18.
23. Leopold JA. Cellular Mechanisms of Aortic Valve Calcification. *Circ Cardiovasc Interv* 2012;5:605-14.
24. Coffey S, Cox B, Williams MJA. The Prevalence, Incidence, Progression, and Risks of Aortic Valve Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:2852-61.
25. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
26. Zhang M, Liu X, Zhang X, Song Z, Han L, He Y, et al. MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2014;147:1073-1080.e2.
27. Rajamannan NM. Calcific Aortic Stenosis: A Disease Ready for Prime Time. *Circulation* 2006;114:2007-9.
28. Patel A, Kirtane AJ. Aortic Valve Stenosis. *JAMA Cardiol* 2016;1:623.

29. Baumgartner H, Hung J, Bermejo J, Chambers JB, Evangelista A, Griffin BP, et al. Echocardiographic Assessment of Valve Stenosis: EAE/ASE Recommendations for Clinical Practice. *J Am Soc Echocardiogr* 2009;22:1-23.
30. Weston MW, LaBorde DV, Yoganathan AP. Estimation of the Shear Stress on the Surface of an Aortic Valve Leaflet. *Ann Biomed Eng* 1999;27:572-9.
31. Balachandran K, Sucosky P, Yoganathan AP. Hemodynamics and Mechanobiology of Aortic Valve Inflammation and Calcification. *Int J Inflam* 2011;2011:1-15.
32. Bäck M, Gasser TC, Michel JB, Caligiuri G. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc Res* 2013;99:232-41.
33. van Ooij P, Markl M, Collins JD, Carr JC, Rigsby C, Bonow RO, et al. Aortic Valve Stenosis Alters Expression of Regional Aortic Wall Shear Stress: New Insights From a 4-Dimensional Flow Magnetic Resonance Imaging Study of 571 Subjects. *J Am Heart Assoc* 2017;6:e005959.
34. Pareti FI, Lattuada A, Bressi C, Zanobini M, Sala A, Steffan A, et al. Proteolysis of von Willebrand Factor and Shear Stress–Induced Platelet Aggregation in Patients With Aortic Valve Stenosis. *Circulation* 2000;102:1290-5.
35. Van Belle E, Vincent F, Rauch A, Casari C, Jeanpierre E, Loobuyck V, et al. von Willebrand Factor and Management of Heart Valve Disease. *J Am Coll Cardiol* 2019;73:1078-88.
36. Siediecki C, Lestini B, Kottke-Marchant K, Eppell S, Wilson D, Marchant R. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996;88:2939-50.
37. Tsai H, Sussman I, Nagel R. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994;83:2171-9.
38. Vincentelli A, Susen S, Le Tourneau T, Six I, Fabre O, Juthier F, et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N Engl J Med* 2003;349:343-9.
39. Heyde E. Gastrointestinal Bleeding in Aortic Stenosis. *N Engl J Med* 1958;259:196-196.
40. Warkentin TE, Moore JC, Morgan DG. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: is acquired von Willebrand's disease the link? *Lancet* 1992;340:35-7.
41. Love J, Jahnke E, Zacharias D, Davidson W, Kidder W, Luan L. Calcific Aortic Stenosis and Gastrointestinal Bleeding. *N Engl J Med* 1980;302:968-968.
42. Godino C, Lauretta L, Pavon AG, Mangieri A, Viani G, Chieffo A, et al. Heyde's Syndrome Incidence and Outcome in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation. *J Am Coll Cardiol* 2013;61:687-9.

43. Saad RA, Lwaleed BA, Kazmi RS. Gastrointestinal Bleeding and Aortic Stenosis (Heyde Syndrome): The Role of Aortic Valve Replacement. *J Card Surg* 2013;28:414-6.
44. Leon MB, Smith CR, Mack M, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N Engl J Med* 2010;363:1597-607.
45. Bouma BJ, van den Brink RBA, van der Meulen JHP, Verheul HA, Cheriex EC, Hamer HPM, et al. To operate or not on elderly patients with aortic stenosis: the decision and its consequences. *Heart* 1999;82:143-8.
46. Iung B, Cachier A, Baron G, Messika-Zeitoun D, Delahaye F, Tornos P, et al. Decision-making in elderly patients with severe aortic stenosis: why are so many denied surgery? *Eur Heart J* 2005;26:2714-20.
47. Mack MJ, Leon MB, Smith CR, Miller DC, Moses JW, Tuzcu EM, et al. 5-year outcomes of transcatheter aortic valve replacement or surgical aortic valve replacement for high surgical risk patients with aortic stenosis (PARTNER 1): a randomised controlled trial. *Lancet* 2015;385:2477-84.
48. Popma JJ, Deeb GM, Yakubov SJ, Mumtaz M, Gada H, O'Hair D, et al. Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Self-Expanding Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med* 2019;380:1706-15.
49. Kapadia S, Agarwal S, Miller DC, Webb JG, Mack M, Ellis S, et al. Insights Into Timing, Risk Factors, and Outcomes of Stroke and Transient Ischemic Attack After Transcatheter Aortic Valve Replacement in the PARTNER Trial (Placement of Aortic Transcatheter Valves). *Circ Cardiovasc Interv* 2016;9:e002981.
50. Thourani VH, Forcillo J, Szeto WY, Kodali SK, Blackstone EH, Lowry AM, et al. Outcomes in 937 Intermediate-Risk Patients Undergoing Surgical Aortic Valve Replacement in PARTNER-2A. *Ann Thorac Surg* 2018;105:1322-9.
51. Muller Moran HR, Eikelboom R, Lodewyckx C, Yan W, Zelentsov I, Arora RC, et al. Two-year outcomes from the PARTNER 3 trial: where do we stand? *Curr Opin Cardiol* 2021;36:141-7.
52. Vincent F, Thourani VH, Ternacle J, Redfors B, Cohen DJ, Hahn RT, et al. Time-of-Day and Clinical Outcomes After Surgical or Transcatheter Aortic Valve Replacement: Insights From the PARTNER Trials. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* 2022;15:e007948.
53. Smith CR, Leon MB, Mack MJ, Miller DC, Moses JW, Svensson LG, et al. Transcatheter versus Surgical Aortic-Valve Replacement in High-Risk Patients. *N Engl J Med* 2011;364:2187-98.
54. Velzenberger E. Rapport d'évaluation de la Haute Autorité de Santé : Critères d'éligibilité des centres implantant des TAVIs. 2020; Available from: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2020-11/rapport_tavis.pdf

55. Van Belle E, Rauch A, Vincent F, Robin E, Kibler M, Labreuche J, et al. Von Willebrand Factor Multimers during Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med* 2016;375:335-44.
56. Rodés-Cabau J, Dauerman HL, Cohen MG, Mehran R, Small EM, Smyth SS, et al. Antithrombotic Treatment in Transcatheter Aortic Valve Implantation: Insights for Cerebrovascular and Bleeding Events. *J Am Coll Cardiol* 2013;62:2349-59.
57. Van Belle E, Hengstenberg C, Lefevre T, Kupatt C, Debry N, Husser O, et al. Cerebral Embolism During Transcatheter Aortic Valve Replacement: The BRAVO-3 MRI Study. *J Am Coll Cardiol* 2016;68:589-99.
58. Guedeney P, Mehran R, Collet JP, Claessen BE, ten Berg J, Dangas GD. Antithrombotic Therapy After Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Circ Cardiovasc Interv* 2019;12:e007411.
59. Nombela-Franco L, Webb JG, de Jaegere PP, Toggweiler S, Nuis RJ, Dager AE, et al. Timing, Predictive Factors, and Prognostic Value of Cerebrovascular Events in a Large Cohort of Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Circulation* 2012;126:3041-53.
60. Kahlert P, Knipp SC, Schlamann M, Thielmann M, Al-Rashid F, Weber M, et al. Silent and Apparent Cerebral Ischemia After Percutaneous Transfemoral Aortic Valve Implantation: A Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Study. *Circulation* 2010;121:870-8.
61. Kodali SK, Williams MR, Smith CR, Svensson LG, Webb JG, Makkar RR, et al. Two-Year Outcomes after Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med* 2012;366:1686-95.
62. Sawaya F, Jørgensen TH, Søndergaard L, De Backer O. Transcatheter Bioprosthetic Aortic Valve Dysfunction: What We Know So Far. *Front Cardiovasc Med* 2019;6.
63. Egbe AC, Pislaru SV, Pellikka PA, Poterucha JT, Schaff HV, Maleszewski JJ, et al. Bioprosthetic Valve Thrombosis Versus Structural Failure: Clinical and Echocardiographic Predictors. *J Am Coll Cardiol* 2015;66:2285-94.
64. Généreux P, Cohen DJ, Mack M, Rodes-Cabau J, Yadav M, Xu K, et al. Incidence, Predictors, and Prognostic Impact of Late Bleeding Complications After Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol* 2014;64:2605-15.
65. Roob G, Schmidt R, Kapeller P, Lechner A, Hartung HP, Fazekas F. MRI evidence of past cerebral microbleeds in a healthy elderly population. *Neurology* 1999;52:991-991.
66. Wilson D, Charidimou A, Ambler G, Fox ZV, Gregoire S, Rayson P, et al. Recurrent stroke risk and cerebral microbleed burden in ischemic stroke and TIA: A meta-analysis. *Neurology* 2016;87:1501-10.

67. Van Belle E, Debry N, Vincent F, Kuchcinski G, Cordonnier C, Rauch A, et al. Cerebral Microbleeds During Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Prospective Magnetic Resonance Imaging Cohort. *Circulation* 2022;146:383-97.
68. Makkar RR, Thourani VH, Mack MJ, Kodali SK, Kapadia S, Webb JG, et al. Five-Year Outcomes of Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement. *N Engl J Med* 2020;382:799-809.
69. Wolff G, Shamekhi J, Al-Kassou B, Tabata N, Parco C, Klein K, et al. Risk modeling in transcatheter aortic valve replacement remains unsolved: an external validation study in 2946 German patients. *Clin Res Cardiol* 2021;110:368-76.
70. Cockburn J, Dooley M, de Belder A, Trivedi U, Hildick-Smith D. A comparison between surgical risk scores for predicting outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *J Cardiovasc Surg* 2017;58:467-72.
71. Baro R, Cura F, Belardi J, Brugaletta S, Lamelas P. Surgical Risk Scoring in TAVR: Still Needed? A Metaregression Analysis. *Curr Probl Cardiol* 2021;46:100875.
72. Sinning JM, Scheer AC, Adenauer V, Ghanem A, Hammerstingl C, Schueler R, et al. Systemic inflammatory response syndrome predicts increased mortality in patients after transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J* 2012;33:1459-68.
73. Lindman BR, Goldstein JS, Nassif ME, Zajarias A, Novak E, Tibrewala A, et al. Systemic inflammatory response syndrome after transcatheter or surgical aortic valve replacement. *Heart* 2015;101:537-45.
74. Khan S, Dargham S, Al Suwaidi J, Jneid H, Abi Khalil C. Trends and Outcomes of Aortic Valve Replacement in Patients With Diabetes in the US. *Front Cardiovasc Med* 2022;9:844068.
75. Matsumoto S, Ohno Y, Miyamoto J, Ikari Y, Tada N, Naganuma T, et al. Impact of diabetes mellitus on outcome after transcatheter aortic valve replacement: Identifying high-risk diabetic population from the OCEAN-TAVI registry. *Catheter Cardiovasc Interv* 2021;98:e1058-65.
76. Lindman BR, Breyley JG, Schilling JD, Vatterott AM, Zajarias A, Maniar HS, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress in patients with aortic stenosis undergoing valve replacement. *Heart* 2015;101:1382-8.
77. Imai K, Okura H, Kume T, Yamada R, Miyamoto Y, Kawamoto T, et al. C-Reactive protein predicts severity, progression, and prognosis of asymptomatic aortic valve stenosis. *Am Heart J* 2008;156:713-8.
78. Kahraman S, Dogan AC, Demirci G, Demir AR, Yilmaz E, Agus HZ, et al. The Prognostic Value of C-reactive Protein to Albumin Ratio in Patients with Isolated Degenerative Aortic Valve Stenosis Undergoing Surgical Aortic Valve Replacement. *Braz J Cardiovasc Surg* 2020;35:299-306.

79. Hioki H, Watanabe Y, Kozuma K, Yamamoto M, Naganuma T, Araki M, et al. Effect of Serum C-Reactive Protein Level on Admission to Predict Mortality After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am J Cardiol* 2018;122:294-301.
80. Seoudy H, Shamekhi J, Voigtländer L, Ludwig S, Frank J, Kujat T, et al. C-Reactive Protein to Albumin Ratio in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Mayo Clin Proc* 2022;97:931-40.
81. Navani RV, Quine EJ, Duffy SJ, Htun NM, Nanayakkara S, Walton AS, et al. Relation of Preprocedure Platelet-to-Lymphocyte Ratio and Major Adverse Cardiovascular Events Following Transcatheter Aortic Valve Implantation for Aortic Stenosis. *Am J Cardiol* 2022;163:65-70.
82. Li H, Zhou Y, Ma Y, Han S, Zhou L. The prognostic value of the platelet-to-lymphocyte ratio in acute coronary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Kardiol Pol* 2017;75:666-73.
83. Condado JF, Junpaparp P, Binongo JN, Lasanajak Y, Witzke-Sanz CF, Devireddy C, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) can risk stratify patients in transcatheter aortic-valve replacement (TAVR). *Int J Cardiol* 2016;223:444-9.
84. Tosu A, Cinar T, Guler A, Kahraman S, Gurbak I. The predictive value of platelet to lymphocyte ratio for procedural complications and mid-term mortality in aortic stenosis patients who underwent a transcatheter aortic valve implantation. *Ann Med Res* 2019;26:537-41.
85. Khalil C, Pham M, Sawant AC, Sinibaldi E, Bhardwaj A, Ramanan T, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts heart failure readmissions and outcomes in patients undergoing transcatheter aortic valve replacement. *Indian Heart J* 2018;70:S313-8.
86. Shahim B, Redfors B, Lindman BR, Chen S, Dahlen T, Nazif T, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratios in Patients Undergoing Aortic Valve Replacement: The PARTNER Trials and Registries. *J Am Heart Assoc* 2022;11:e024091.
87. Xu X, Li Z, Gao W. Growth differentiation factor 15 in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Biomarkers* 2011;16:466-75.
88. Shimpo M, Morrow DA, Weinberg EO, Sabatine MS, Murphy SA, Antman EM, et al. Serum Levels of the Interleukin-1 Receptor Family Member ST2 Predict Mortality and Clinical Outcome in Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2004;109:2186-90.
89. Ky B, French B, McCloskey K, Rame JE, McIntosh E, Shahi P, et al. High-Sensitivity ST2 for Prediction of Adverse Outcomes in Chronic Heart Failure. *Circ Heart Fail* 2011;4:180-7.
90. Masson S, Latini R, Anand IS, Barlera S, Angelici L, Vago T, et al. Prognostic Value of Changes in N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide in Val-HeFT (Valsartan Heart Failure Trial). *J Am Coll Cardiol* 2008;52:997-1003.

91. Koskinas KC, O'Sullivan CJ, Heg D, Praz F, Stortecky S, Pilgrim T, et al. Effect of B-type Natriuretic Peptides on Long-Term Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am J Cardiol* 2015;116:1560-5.
92. Krau NC, Lünstedt NS, Freitag-Wolf S, Brehm D, Petzina R, Lutter G, et al. Elevated growth differentiation factor 15 levels predict outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation: GDF15 predicts outcome in TAVI patients. *Eur J Heart Fail* 2015;17:945-55.
93. Sinning JM, Wollert KC, Sedaghat A, Widera C, Radermacher MC, Descoups C, et al. Risk scores and biomarkers for the prediction of 1-year outcome after transcatheter aortic valve replacement. *Am Heart J* 2015;170:821-9.
94. López-Otero D, Trillo-Nouche R, Gude F, Cid-Álvarez B, Ocaranza-Sanchez R, Álvarez MS, et al. Pro B-type natriuretic peptide plasma value: A new criterion for the prediction of short- and long-term outcomes after transcatheter aortic valve implantation. *Int J Cardiol* 2013;168:1264-8.
95. Oury C, Nchimi A, Lancellotti P, Bergler-Klein J. Can Blood Biomarkers Help Predicting Outcome in Transcatheter Aortic Valve Implantation? *Front Cardiovasc Med* 2018;5:31.
96. Ingersoll MA, Platt AM, Potteaux S, Randolph GJ. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol* 2011;32:470-7.
97. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One* 2017;12:e0176460.
98. Austermann J, Roth J, Barczyk-Kahlert K. The Good and the Bad: Monocytes' and Macrophages' Diverse Functions in Inflammation. *Cells* 2022;11:1979.
99. Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, et al. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation¹. *J Thromb Haemost* 2006;4:1323-30.
100. Alshehri FSM, Whyte CS, Tuncay A, Williams ML, Wilson HM, Mutch NJ. Monocytes Expose Factor XIII-A and Stabilize Thrombi against Fibrinolytic Degradation. *Int J Mol Sci* 2021;22:6591.
101. Seillier C, Hélie P, Petit G, Vivien D, Clemente D, Le Mauff B, et al. Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response. *Cell Immunol* 2022;371:104451.
102. Gaertner F, Massberg S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin Immunol* 2016;28:561-9.
103. Darbousset R, Thomas GM, Mezouar S, Frère C, Bonier R, Mackman N, et al. Tissue factor—positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012;120:2133-43.

104. Müller I, Klocke A, Alex M, Kotsch M, Luther T, Morgenstern E, et al. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003;17:476-8.
105. Libby P, Simon DI. Inflammation and Thrombosis. *Circulation* 2001;103:1718-20.
106. Dupont A, Rauch A, Staessens S, Moussa M, Rosa M, Corseaux D, et al. Vascular Endothelial Damage in the Pathogenesis of Organ Injury in Severe COVID-19. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2021;41:1760-73.
107. Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front Immunol* 2013;4.
108. Connaughton EP, Naicker S, Hanley SA, Slevin SM, Eykelenboom JK, Lowndes NF, et al. Phenotypic and functional heterogeneity of human intermediate monocytes based on HLA-DR expression. *Immunol Cell Biol* 2018;96:742-58.
109. Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:1306-16.
110. Cormican S, Griffin MD. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights From Gene Expression Analysis. *Front Immunol* 2020;11:1070.
111. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 2010;33:375-86.
112. Wong KL, Tai JY, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011;118:e16-31.
113. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, et al. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011;118:e50-61.
114. Oh ES, Na M, Rogers CJ. The Association Between Monocyte Subsets and Cardiometabolic Disorders/Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cardiovasc Med* 2021;8:640124.
115. Zeynalova S, Bucksch K, Scholz M, Yahiaoui-Doktor M, Gross M, Löffler M, et al. Monocyte subtype counts are associated with 10-year cardiovascular disease risk as determined by the Framingham Risk Score among subjects of the LIFE-Adult study. *PLoS One* 2021;16:e0247480.
116. Wildgruber M, Aschenbrenner T, Wendorff H, Czubba M, Glinzer A, Haller B, et al. The "Intermediate" CD14⁺⁺CD16⁺ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci Rep* 2016;6:39483.

117. Elchinova E, Teubel I, Roura S, Fernández MA, Lupón J, Gálvez-Montón C, et al. Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis. *PLoS One* 2018;13:e0204074.
118. Rogacev KS, Cremers B, Zawada AM, Seiler S, Binder N, Ege P, et al. CD14⁺⁺CD16⁺ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *J Am Coll Cardiol* 2012;60:1512-20.
119. Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, Kuroi A, Ishibashi K, Komukai K, et al. Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010;212:628-35.
120. Ozaki Y, Imanishi T, Hosokawa S, Nishiguchi T, Taruya A, Tanimoto T, et al. Association of Toll-Like Receptor 4 on Human Monocyte Subsets and Vulnerability Characteristics of Coronary Plaque as Assessed by 64-Slice Multidetector Computed Tomography. *Circ J* 2017;81:837-45.
121. Shimoni S, Meledin V, Bar I, Fabricant J, Gandelman G, George J. Circulating CD14(+) monocytes in patients with aortic stenosis. *J Geriatr Cardiol* 2016;13:81-7.
122. Efe TH, Gayretli Yayla K, Yayla C, Ertem AG, Cimen T, Erken Pamukcu H, et al. Calcific aortic stenosis and its correlation with a novel inflammatory marker, the lymphocyte/monocyte ratio. *Rev Port Cardiol* 2016;35:573-8.
123. Hewing B, Ellerbroek R, Au SCD, Stangl V, Dreger H, Laule M, et al. Levels of Circulating Intermediate Monocytes Decrease after Aortic Valve Replacement in Patients with Severe Aortic Stenosis. *Thromb Haemost* 2017;117:2346-55.
124. Neuser J, Galuppo P, Fraccarollo D, Willig J, Kempf T, Berliner D, et al. Intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes decline after transcatheter aortic valve replacement and correlate with functional capacity and left ventricular systolic function. *PLoS One* 2017;12:e0183670.
125. Hoffmann J, Mas-Peiro S, Berkowitsch A, Boeckling F, Rasper T, Pieszko K, et al. Inflammatory signatures are associated with increased mortality after transfemoral transcatheter aortic valve implantation. *ESC Heart Failure* 2020;7:2597-610.
126. Pfluecke C, Wydra S, Berndt K, Tarnowski D, Cybularz M, Jellinghaus S, et al. Mon2-monocytes and increased CD-11b expression before transcatheter aortic valve implantation are associated with earlier death. *Int J Cardiol* 2020;318:115-20.
127. Cybularz M, Wydra S, Berndt K, Poitz DM, Barthel P, Alkouri A, et al. Frailty is associated with chronic inflammation and pro-inflammatory monocyte subpopulations. *Exp Gerontol* 2021;149:111317.
128. Baratchi S, Zaldivia MTK, Wallert M, Loseff-Silver J, Al-Aryahi S, Zamani J, et al. Transcatheter Aortic Valve Implantation Represents an Anti-Inflammatory Therapy Via Reduction of Shear Stress-Induced, Piezo-1-Mediated Monocyte Activation. *Circulation* 2020;142:1092-105.

129. Gluba-Brzózka A, Franczyk B, Rysz-Górczyńska M, Ławiński J, Rysz J. Emerging Anti-Atherosclerotic Therapies. *Int J Mol Sci* 2021;22:12109.
130. Hafiane A, Daskalopoulou SS. Targeting the residual cardiovascular risk by specific anti-inflammatory interventions as a therapeutic strategy in atherosclerosis. *Pharmacol Res* 2022;178:106157.
131. Libby P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy. *J Am Coll Cardiol* 2017;70:2278-89.
132. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, MacFadyen JG, Chang WH, Ballantyne C, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med* 2017;377:1119-31.
133. Winter C, Soehnlein O. The potential of chronopharmacology for treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2018;29:368-74.
134. Gao L, Zeng H, Zhang T, Mao C, Wang Y, Han Z, et al. MicroRNA-21 deficiency attenuated atherogenesis and decreased macrophage infiltration by targeting Dusp-8. *Atherosclerosis* 2019;291:78-86.
135. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. *N Engl J Med* 1998;339:1349-57.
136. Gheorghe G, Toth PP, Bungau S, Behl T, Ilie M, Pantea Stoian A, et al. Cardiovascular Risk and Statin Therapy Considerations in Women. *Diagnostics* 2020;10:483.
137. Rossebø AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. *N Engl J Med* 2008;359:1343-56.
138. Arefieva TI, Filatova AY, Potekhina AV, Shchinova AM. Immunotropic Effects and Proposed Mechanism of Action for 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase Inhibitors (Statins). *Biochemistry* 2018;83:874-89.
139. Peri-Okonny PA, Liu Y, Malaisrie SC, Huded CP, Kapadia S, Thourani VH, et al. Association of Statin Use and Mortality After Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Heart Assoc* 2019;8:e011529.
140. Huded CP, Benck LR, Stone NJ, Sweis RN, Ricciardi MJ, Malaisrie SC, et al. Relation of Intensity of Statin Therapy and Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Am J Cardiol* 2017;119:1832-8.
141. Sasaki K, Watanabe Y, Kozuma K, Kataoka A, Hioki H, Nagura F, et al. Comparison of long-term mortality in patients who underwent transcatheter aortic valve replacement with or without anti-atherosclerotic therapy. *Heart Vessels* 2021;36:1892-902.

142. Lipschitz D, Udupa K, Milton K, Thompson C. Effect of age on hematopoiesis in man. *Blood* 1984;63:502-9.
143. Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, et al. Hematopoietic Stem Cell Quiescence Promotes Error-Prone DNA Repair and Mutagenesis. *Cell Stem Cell* 2010;7:174-85.
144. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science* 2019;366:eaan4673.
145. Fabre MA, de Almeida JG, Fiorillo E, Mitchell E, Damaskou A, Rak J, et al. The longitudinal dynamics and natural history of clonal haematopoiesis. *Nature* 2022;606:335-42.
146. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:2488-98.
147. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Barhdadi A, Bourgoin V, Lépine G, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood* 2017;130:753-62.
148. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014;20:1472-8.
149. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood* 2015;125:1367-76.
150. Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* 2013;122:3616-27.
151. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med* 2017;377:111-21.
152. Böhme M, Desch S, Rosolowski M, Scholz M, Krohn K, Büttner P, et al. Impact of Clonal Hematopoiesis in Patients With Cardiogenic Shock Complicating Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2022;80:1545-56.
153. Marnell CS, Bick A, Natarajan P. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP): Linking somatic mutations, hematopoiesis, chronic inflammation and cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* 2021;161:98-105.
154. Dorsheimer L, Assmus B, Rasper T, Ortmann CA, Ecke A, Abou-El-Ardat K, et al. Association of Mutations Contributing to Clonal Hematopoiesis With Prognosis in Chronic Ischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol* 2019;4:25.

155. Abplanalp WT, Mas-Peiro S, Cremer S, John D, Dimmeler S, Zeiher AM. Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential With Inflammatory Gene Expression in Patients With Severe Degenerative Aortic Valve Stenosis or Chronic Postischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol* 2020;5:1170-5.
156. Kiefer KC, Cremer S, Pardali E, Assmus B, Abou-El-Ardat K, Kirschbaum K, et al. Full spectrum of clonal haematopoiesis-driver mutations in chronic heart failure and their associations with mortality. *ESC Heart Failure* 2021;8:1873-84.
157. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, Chan W, Jäger M, Yoshida K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia* 2018;32:1908-19.
158. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, Bourgoin V, Mollica L, Dubé MP, et al. Lineage restriction analyses in CHIP indicate myeloid bias for TET2 and multipotent stem cell origin for DNMT3A. *Blood* 2018;132:277-80.
159. Abplanalp WT, Cremer S, John D, Hoffmann J, Schuhmacher B, Merten M, et al. Clonal Hematopoiesis–Driver DNMT3A Mutations Alter Immune Cells in Heart Failure. *Circ Res* 2021;128:216-28.
160. Lim GB. Clonal haematopoiesis induces a pro-inflammatory monocyte phenotype in HF. *Nat Rev Cardiol* 2021;18:74-74.
161. Zhang Q, Zhao K, Shen Q, Han Y, Gu Y, Li X, et al. Tet2 is required to resolve inflammation by recruiting Hdac2 to specifically repress IL-6. *Nature* 2015;525:389-93.
162. Cong B, Zhang Q, Cao X. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation. *Protein Cell* 2021;12:165-73.
163. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* 2017;355:842-7.
164. Sano S, Oshima K, Wang Y, MacLauchlan S, Katanasaka Y, Sano M, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:875-86.
165. Wang W, Liu W, Fidler T, Wang Y, Tang Y, Woods B, et al. Macrophage Inflammation, Erythrophagocytosis, and Accelerated Atherosclerosis in Jak2V617F Mice. *Circ Res* 2018;123:e35-47.
166. Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ, et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Sci Transl Med* 2018;10:eaan8292.

167. Mas-Peiro S, Hoffmann J, Fichtlscherer S, Dorsheimer L, Rieger MA, Dimmeler S, et al. Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J* 2020;41:933-9.
168. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep* 2015;5:13886.
169. Zhou Y, Zhou B, Pache L, Chang M, Khodabakhshi AH, Tanaseichuk O, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nat Commun* 2019;10:1523.
170. Dutta P, Nahrendorf M. Monocytes in Myocardial Infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015;35:1066-70.
171. Van Craenenbroeck AH, Van Ackeren K, Hoymans VY, Roeykens J, Verpooten GA, Vrints CJ, et al. Acute Exercise-Induced Response of Monocyte Subtypes in Chronic Heart and Renal Failure. *Mediators Inflamm* 2014;2014:1-11.
172. Steppich B, Dayyani F, Gruber R, Lorenz R, Mack M, Ziegler-Heitbrock HWL. Selective mobilization of CD14⁺ CD16⁺ monocytes by exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;279:C578-86.
173. Nunez J, Minana G, Bodi V, Nunez E, Sanchis J, Husser O, et al. Low Lymphocyte Count and Cardiovascular Diseases. *Curr Med Chem* 2011;18:3226-33.
174. Thomas GD, Hamers AAJ, Nakao C, Marcovecchio P, Taylor AM, McSkimming C, et al. Human Blood Monocyte Subsets: A New Gating Strategy Defined Using Cell Surface Markers Identified by Mass Cytometry. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:1548-58.
175. Hofer TP, van de Loosdrecht AA, Stahl-Hennig C, Cassatella MA, Ziegler-Heitbrock L. 6-Sulfo LacNAc (Slan) as a Marker for Non-classical Monocytes. *Front Immunol* 2019;10:2052.
176. Conway EM. Thrombomodulin and its role in inflammation. *Semin Immunopathol* 2012;34:107-25.
177. Yuksel M, Okajima K, Uchiba M, Horiuchi S, Okabe H. Activated protein C inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production by inhibiting activation of both nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in human monocytes. *Thromb Haemost* 2002;88:267-73.
178. Okamoto T, Tanigami H, Suzuki K, Shimaoka M. Thrombomodulin: A Bifunctional Modulator of Inflammation and Coagulation in Sepsis. *Crit Care Res Pract* 2012;2012:1-10.
179. Lassalle F, Rosa M, Staels B, Van Belle E, Susen S, Dupont A. Circulating Monocyte Subsets and Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Int J Mol Sci* 2022;23:5303.

180. Ostrander EL, Kramer AC, Mallaney C, Celik H, Koh WK, Fairchild J, et al. Divergent Effects of Dnmt3a and Tet2 Mutations on Hematopoietic Progenitor Cell Fitness. *Stem Cell Reports* 2020;14:551-60.
181. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 2013;500:415-21.
182. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cell* 2012;150:264-78.
183. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* 2014;371:2477-87.
184. Jaiswal S. Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. *Blood* 2020;136:1606-14.
185. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, van de Vorst M, Vermeulen SH, Kiemeny LALM, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet* 2017;101:50-64.
186. Yu B, Roberts MB, Raffield LM, Zekavat SM, Nguyen NQH, Biggs ML, et al. Association of Clonal Hematopoiesis With Incident Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 2021;78:42-52.
187. Cai Z, Kotzin JJ, Ramdas B, Chen S, Nelanuthala S, Palam LR, et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis. *Cell Stem Cell* 2018;23:833-849.e5.
188. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, Tran HT, Kılıç R, Sarıkoç A, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2003;170:205-11.
189. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, Bertrand OF, Diaz R, Maggioni AP, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med* 2019;381:2497-505.
190. Lu J, Xie S, Deng Y, Xie X, Liu Y. Blocking the NLRP3 inflammasome reduces osteogenic calcification and M1 macrophage polarization in a mouse model of calcified aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2022;347:28-38.
191. Sridhar S, Pham DH, Gee TW, Hua J, Butcher JT. Monocytes and macrophages in heart valves: Uninvited guests or critical performers? *Curr Opin Biomed Eng* 2018;5:82-9.
192. Kapadia S, Agarwal S, Miller DC, Webb JG, Mack M, Ellis S, et al. Insights Into Timing, Risk Factors, and Outcomes of Stroke and Transient Ischemic Attack After Transcatheter Aortic Valve Replacement in the PARTNER Trial. *Circ Cardiovasc Interv* 2016;9:e002981.
193. Favalaro EJ, Henniker A, Facey D, Hertzberg M. Discrimination of von Willebrands disease (VWD) subtypes: direct comparison of von Willebrand factor:collagen binding assay

(VWF:CBA) with monoclonal antibody (MAB) based VWF-capture systems. Thromb Haemost 2000;84:541-7.

ANNEXES

Annexe 1

Liste des 67 gènes du panel Twist analysés par séquençage haut-débit

<i>ANKRD26</i>	Ankyrin Repeat Domain Containing 26
<i>ASXL1</i>	Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 1
<i>ASXL2</i>	Additional Sex Combs Like Transcriptional Regulator 2
<i>ATRX</i>	ATRX Chromatin Remodeler
<i>BCOR</i>	BCL6 Corepressor
<i>BCORL1</i>	BCL6 Corepressor Like 1
<i>BRAF</i>	B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase
<i>CALR</i>	Calreticulin
<i>CBL</i>	Cbl Proto-Oncogene
<i>CEBPA</i>	CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha
<i>CRLF2</i>	Cytokine Receptor Like Factor 2
<i>CSF3R</i>	Colony Stimulating Factor 3 Receptor
<i>CUX1</i>	Cut Like Homeobox 1
<i>DDX41</i>	DEAD-Box Helicase 41
<i>DNMT3A</i>	DNA Methyltransferase 3 Alpha
<i>ETNK1</i>	Ethanolamine Kinase 1
<i>ETV6</i>	ETS Variant Transcription Factor 6
<i>EZH2</i>	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
<i>FLT3</i>	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 3
<i>GATA1</i>	GATA Binding Protein 1
<i>GATA2</i>	GATA Binding Protein 2
<i>GNAS</i>	GNAS Complex Locus
<i>GNB1</i>	G Protein Subunit Beta 1
<i>HRAS</i>	HRas Proto-Oncogene, GTPase
<i>IDH1</i>	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1
<i>IDH2</i>	Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2
<i>IKZF1</i>	IKAROS Family Zinc Finger 1
<i>IL2RG</i>	Interleukin 2 Receptor Subunit Gamma
<i>IL7R</i>	Interleukin 7 Receptor
<i>JAK1</i>	Janus Kinase 1
<i>JAK2</i>	Janus Kinase 2
<i>JAK3</i>	Janus Kinase 3
<i>KDM6A</i>	Lysine Demethylase 6A
<i>KIT</i>	KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
<i>KRAS</i>	KRAS Proto-Oncogene, GTPase
<i>MPL</i>	MPL Proto-Oncogene, Thrombopoietin Receptor
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1
<i>NFE2</i>	Nuclear Factor, Erythroid 2

<i>NPM1</i>	Nucleophosmin 1
<i>NRAS</i>	NRAS Proto-Oncogene, GTPase
<i>PAX5</i>	Paired Box 5
<i>PHF6</i>	PHD Finger Protein 6
<i>PPM1D</i>	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1D
<i>PTPN11</i>	Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11
<i>RAD21</i>	RAD21 Cohesin Complex Component
<i>RIT1</i>	Ras Like Without CAAX 1
<i>RUNX1</i>	RUNX Family Transcription Factor 1
<i>SAMD9</i>	Sterile Alpha Motif Domain Containing 9
<i>SAMD9L</i>	Sterile Alpha Motif Domain Containing 9 Like
<i>SETBP1</i>	SET Binding Protein 1
<i>SF3B1</i>	Splicing Factor 3b Subunit 1
<i>SH2B3</i>	SH2B Adaptor Protein 3
<i>SMC1A</i>	Structural Maintenance Of Chromosomes 1A
<i>SMC3</i>	Structural Maintenance Of Chromosomes 3
<i>SRP72</i>	Signal Recognition Particle 72
<i>SRSF2</i>	Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2
<i>STAG2</i>	Stromal Antigen 2
<i>STAT3</i>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
<i>STAT5B</i>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 5B
<i>TERC</i>	Telomerase RNA Component
<i>TERT</i>	Telomerase Reverse Transcriptase
<i>TET2</i>	Tet Methylcytosine Dioxygenase 2
<i>TP53</i>	Tumor Protein P53
<i>U2AF1</i>	U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1
<i>UBA1</i>	Ubiquitin Like Modifier Activating Enzyme 1
<i>WT1</i>	WT1 Transcription Factor
<i>ZRSR2</i>	Zinc Finger CCCH-Type, RNA Binding Motif And Serine/Arginine Rich 2

Annexe 2

Circulating Monocyte Subsets and Transcatheter Aortic Valve Replacement

Fanny Lassalle¹, Mickael Rosa¹, Bart Staels¹, Eric Van Belle¹, Sophie Susen¹, Annabelle Dupont¹

¹Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011-EGID, F-59000 Lille, France

Corresponding author: Annabelle Dupont, email: annabelle.dupont@univ-lille.fr; Tel: +33320444783

Keywords: transcatheter aortic valve replacement; aortic valve stenosis; monocytes; monocyte subsets; inflammation; thromboinflammation; shear stress

Abstract:

Transcatheter aortic valve replacement (TAVR), as an alternative to open heart surgery, has revolutionized the treatment of severe aortic valve stenosis (AVS), the most common valvular disorder in the elderly. AVS is now considered a form of atherosclerosis and, like the latter, partly of inflammatory origin. Patients with high-grade AVS have a highly disturbed blood flow associated with high levels of shear stress. The immediate reopening of the valve during TAVR leads to a sudden restoration of a normal blood flow hemodynamic. Despite its good prognosis for patients, TAVR remains associated with bleeding or thrombotic postprocedural complications, involving mechanisms that are still poorly understood. Many studies report the close link between blood coagulation and inflammation, termed thromboinflammation, including monocytes as a major actor. The TAVR procedure represents a unique opportunity to study the influence of shear stress on human monocytes, key mediators of inflammation and hemostasis processes. The purpose of this study was to conduct a review of the literature to provide a comprehensive overview of the impact of TAVR on monocyte phenotype and subset repartition and the association of these parameters with the clinical outcomes of patients with severe AVS who underwent TAVR.

1. Introduction

Aortic valve stenosis (AVS) represents the most common heart valve disease in the elderly and is associated with significant morbidity and mortality when left untreated [1]. This chronic inflammatory disease is characterized by a high abundance of monocyte-derived macrophages infiltrated in the aortic valve tissue [2], promoting fibrosis and ultimately calcification of valve leaflets leading to a narrowing of the aortic valve opening, high shear stress conditions, a decrease of the arterial pulsatility and an increase of the valvular rigidity [3–6].

Today, surgical or transcatheter aortic valve replacement (TAVR) is the only available treatment option in patients with severe AVS [7]. In less than 20 years, TAVR has rapidly emerged as the preferred procedure for inoperable and high-surgical risk patients and recent recommendations propose to expand its indications to patients with lower-surgical risk [8,9]. However, the TAVR procedure remains associated with significant bleeding or thrombotic complications affecting short- or long-term morbidity and mortality [10]. The exact cellular and molecular mechanisms involved in these complications are still unclear and even if some biomarkers have been proposed to predict patient outcomes after TAVR, they showed limited performance and studies are still needed [11]. Furthermore, through the immediate restoration of the blood flow and reduction of the shear stress, TAVR represents a unique model for studying the impact of the blood flow pulsatility on hemostasis components and circulating blood cells, especially monocytes, the *largest cells* of the blood which play a key role in inflammation and hemostasis processes, linking innate and adaptive immunity.

The historical view of the biology of monocytes has been overhauled in recent times, including their phenotypic and functional heterogeneity as well as their high sensibility to changes in

their environment [12,13]. Moreover, specific monocyte subsets have already been associated with cardiovascular diseases and were shown to possess prognostic value in this context [14,15].

The aim of this review is to highlight recent advances regarding the effects of TAVR on monocyte functions and subset repartition as well as the prognostic value of these parameters on clinical outcomes in patients with severe AVS undergoing TAVR. To our knowledge, this is the first review of the literature on the relationship between circulating monocyte subset distribution and phenotype in the context of TAVR in patients with severe AVS. Given the important prevalence of this pathology and the significant rate of complications occurring after TAVR, this review aims to help with the prediction and understanding of these complications. At the same time, therapeutic strategies that modulate monocyte phenotype, for example, to reduce their recruitment to atherosclerotic plaques, have recently been proposed to be efficient on atherosclerosis in both animal models and a few clinical experiments [16]. An increased understanding of monocyte phenotypes and their role in TAVR complications is necessary for the development of new therapeutic approaches and is very important, since, to date, no pharmacological therapy has been shown to improve the outcomes of these patients.

2. Physiopathology of Aortic Valve Stenosis

AVS is the most prevalent valve disease in the elderly with an estimated prevalence from 2 to 7% in the population aged 65 years or over worldwide [17,18]. This prevalence will increase in the next decades due to an ageing population. AVS is defined by a narrowing of the aortic valve, caused by stiffening of the three valve leaflets, restricting its ability to open normally.

Calcific aortic valve disease begins with an asymptomatic phase named aortic sclerosis, characterized by a moderate thickening of the aortic valve, an infiltration of some inflammatory blood cells such as monocytes and calcium deposits but without significant blood flow obstruction. The prevalence of aortic sclerosis is estimated to be 20 to 30% in people over 65 years old and almost 50% in people aged over 85 years old in developed countries [18,19]. The evolution from aortic sclerosis to AVS is slow and concerns around 1.9% of patients per year.

AVS was previously regarded as an age-related degenerative process caused by passive calcium deposition in the valve. However, recent data challenged this concept and the valve calcification is now understood as an active inflammatory process developing through an initial endothelial injury induced by high shear stress, leading to infiltration of a large number of monocytes in the aortic valve tissue, where they differentiate into macrophages able to oxidize lipids and secrete inflammatory cytokines, chemokines and growth factors, such as tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase (MMPs), leading to matrix remodeling and neovascularization [1,5,20]. Moreover, via the secretion of TGF- β 1 and other inflammatory cytokines and the release of extracellular microvesicles, macrophages promote valvular interstitial cell differentiation into an osteoblastic phenotype leading to the mineralization of the extracellular matrix, and formation of calcium nodules [21,22]. Eventually, aortic cusps are calcified and the valve is stenosed, obstructing the ejection of the blood from the left ventricle to the aorta, leading to cardiac symptomatology.

3. Impact of Aortic Valve Stenosis on Hemodynamic Features of Blood Flow

Cardiac valves are dynamic and closely interact with the surrounding hemodynamic and mechanical environment. In normal conditions, the aortic valve opens and closes with every heartbeat, maintaining the blood velocity and pressure gradient between the aorta and the left ventricle, experiencing the maximum shear stress during the peak systole [23]. The incomplete opening of the valve occurring during AVS produces an obstruction to the blood flow with a decrease of the arterial pulsatility and an increase of the valvular rigidity. The disturbed and turbulent blood flow leads to high shear stress impacting vascular endothelial cells and circulating blood cells [24–26].

These hemodynamic disorders also increase Von Willebrand factor (VWF) susceptibility to proteolytic cleavage by its main protease, a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) [27,28]. VWF is a multimeric plasma glycoprotein which plays a crucial role in primary hemostasis by mediating blood platelet adhesion to the damaged vessel wall and subsequently platelet aggregation. It circulates in the plasma in an inactive globular conformation [29], but under high shear stress conditions, the protein unfolds and changes into an extended chain conformation, with the unmasking of its platelet binding sites leading to platelet adhesion and aggregation. In AVS, the high fluid shear stress promotes VWF unfolding and the prolonged exposure of the cleavage site by ADAMTS13 [30] induces an enhanced proteolysis. The loss of the VWF high molecular weight multimers resulting from this proteolysis by ADAMTS13 leads to acquired Von Willebrand syndrome [31] with potential mucocutaneous bleeding complications due to gastrointestinal angiodysplasia, known as Heyde's syndrome [32,33]. These AVS consequences are resolved after aortic valve replacement [34–36].

4. Transcatheter Aortic Valve Replacement and Complications

Symptomatic severe AVS is associated with high mortality rates, up to 50% within one year, when left untreated [37]. No pharmacological treatment has been proven to delay the progression of AVS or to improve survival. Until recently, surgical valve replacement was the only therapeutic option. However, many older patients with severe AVS were contraindicated for open-heart surgery to replace stenosed aortic valves. First performed in 2002, TAVR has emerged as an alternative option for this group of patients and, recently, North American and European AVS treatment guidelines expanded its indications to younger patients with lower surgical risk [8,9].

TAVR is a minimally invasive procedure that consists of the implantation and deployment of a new biological valve through the femoral artery into the stenosed valve with a stent. The restoration of the valve opening and thus of the blood flow leads to an instantaneous normalization of the shear stress. The replacement of the stenosed valve also allows the immediate correction of the VWF alterations [31] with the restoration of the high molecular weight multimers 5 minutes after the new valve deployment [38].

However, despite a clear improvement in the patient's prognosis and quality of life, TAVR remains associated with significant bleeding or thrombotic postprocedural complications and the management of patients after TAVR needs to be optimized. The major preoccupation is the risk of cerebral vascular accident that occurs in 3.5% of cases in the 30 days after TAVR [39,40] and 7% of cases within the first year after TAVR [41]. The occurrence of these strokes can also be asymptomatic but responsible for a premature cognitive decline [42]. Thus, silent strokes were detected by magnetic resonance imaging, performed a few days after the procedure, in more than three-quarters of the patients [43]. Short-term bleeding

complications can also appear after TAVR, such as gastrointestinal bleeding (30% within 2 months) [44,45] or cerebral microbleeds (10% within 30 days) [39]. On the long-term complications, structural degeneration of the valve (tear, calcification or fibrosis) is observed in 5% of cases within 5 years [46] and prosthesis thrombosis in 1% within 5 years [47]. Finally, the mortality from cardiac causes is estimated at 30% at 5 years after TAVR [48].

5. Markers for Predicting Post-TAVR Complications

For TAVR perioperative risk assessment, scores such as the Society of Thoracic Surgeons (STS) risk-score for predicting mortality and the European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE II), based on clinical parameters, are routinely used [49]. However, these risk scores assess surgical risk and present mediocre performance in predicting outcomes after TAVR [50]. Additional parameters or biomarkers predicting outcomes after TAVR are needed. They will also allow the identification of patients who will benefit most from the TAVR procedure, as the indications for TAVR continue to expand.

As a systemic inflammation response occurs within 48 h after TAVR procedure in approximately 50% of patients in the absence of clinical infection and has been associated with adverse outcomes in TAVR patients, some teams tried to predict the short- and long-term TAVR complications (stroke, myocardial infarction, mortality) by measuring circulating biomarkers related to inflammation [51]. Thus, some studies demonstrated that increased pre-TAVR C-reactive protein (CRP) was independently associated with increased mortality in patients who underwent TAVR [52–55]. Recently, Navani et al. [56] focused on the platelet-to-lymphocyte ratio (PLR), an inflammatory biomarker associated with poor prognosis in patients with acute coronary syndrome [57] and did not observe an association of this

biomarker, evaluated before TAVR, with the occurrence of a major adverse cardiac event (MACE), 30 days after TAVR, in a cohort of 470 patients; whereas Condado et al. observed a positive association between preprocedure PLR and MACE 30 days after TAVR in a group of 520 patient [58] and Tosu et al. [59] demonstrated in a cohort of 100 patients that an elevated preprocedure PLR was predictive of adverse outcomes (vascular complications, stroke and mortality) at 6 months after TAVR. These conflicting results may be explained by differences in the study population concerning especially the procedural risk and in the cut-off values used for PLR. Condado et al. also observed an association between elevated baseline neutrophil-to-lymphocyte ratio (NLR) and the occurrence of adverse outcomes within 30 days after TAVR; and Khalil et al. reported that NLR predicts all-cause mortality, MACE and heart failure hospitalization one year after TAVR [60]. Other studies focused on two inflammatory biomarkers, the growth differentiation factor (GDF)-15 and the soluble suppression of tumorigenicity (ST)2 (an IL-1 receptor) and reported that high levels pre-TAVR of these markers were associated with poor postprocedure outcomes [61–63]. Finally, these data suggest that circulating biomarkers, in addition to clinical risk scores, might help to predict complications of TAVR. However, large randomized studies are needed to clarify the utility of these biomarkers to predict outcomes of post-TAVR patients or guide clinical care [64].

6. Human Monocyte Heterogeneity

Monocytes are known for their very important role in tissue homeostasis and the innate immune system. Originating from bone marrow, they continuously enter the blood circulation, where they constitute 8 to 10% of the total leukocyte population in humans. During infection or damage, they are recruited into tissues where they rapidly differentiate

into macrophages or dendritic cells to exert their role in inflammation, immune defense, phagocytosis or tissue repair [65].

Human monocytes are now classified into three functionally different subsets, based on the expression of superficial cluster differentiation CD14 (a cell co-receptor for lipopolysaccharide) and CD16 (the low-affinity Fc receptor III for IgG), with different phenotypes and functions in homeostasis and diseases [14,66,67] (Table 1).

Classical monocytes (CD14⁺⁺ CD16⁻) are generally short-lived cells surviving for only one day. They are rapidly mobilized into infected or injured sites and are involved in diverse functions such as phagocytosis, infection control, inflammation regulation and tissue repair. Among the three monocyte subsets, they present the greatest migration capacity in tissues [68].

Non-classical monocytes (CD14⁺ CD16⁺⁺) patrol endothelial cell integrity, clear dying endothelial cells, and protect vessel health. They survive for 7 days in humans and can be recruited into sites of vascular injury or infection or enter into the areas of inflammation, such as atherosclerotic plaques [69].

A third monocyte subset has also been described. They are referred to as intermediate monocytes (CD14⁺⁺ CD16⁺), which are variously described as closely resembling either classical or non-classical monocytes. They express a high degree of MHC class II gene presentation, conferring them a predominant role in inducing T-cell proliferation and stimulation and are recruited at a later stage of inflammation. The classical (CD16⁻) and intermediate/non-classical (CD16⁺) monocytes represent 80–90% and 10–15% of total monocytes, respectively.

Although a large number of studies have focused on the differentiation of human monocyte subsets, the mechanisms regulating their recruitment into tissues and their functional and

dynamic role in inflammation and immunity, there are still many aspects that need to be clarified. In this way, Cormican and Griffin [70], in a recent review about the gene expression analysis of monocyte subsets performed in the literature, pointed out conflicting results. The biggest inconsistencies remain in the production of proinflammatory cytokines by the different monocyte subsets. While Cros et al. [71] reported that classical monocytes produce high levels of reactive oxygen species (ROS) and intermediate monocytes have the highest production of TNF α and IL-1 β but do not produce ROS, Wong et al. [72] showed that TNF α and IL-1 β were essentially produced by non-classical monocytes with a low production of all cytokines for intermediate monocytes. Finally, Zawada et al. [73] attest that classical monocytes have the lowest production of ROS, produced the most by intermediate monocytes. It should be noted that the lack of standardization in the flow cytometry protocols for gating the different monocyte subsets can contribute to these discrepancies among studies. In any case, monocyte differentiation in these subsets seems to be tightly regulated, with the mechanisms still poorly understood.

Many studies report the close link between blood coagulation and the innate immune system, termed “thromboinflammation” or “immunothrombosis”. Indeed, activated monocytes express on their surface a tissue factor [74] that has an essential role in the coagulation cascade, by activating factor VII which initiates the coagulation *in vivo*, leading to the release of thrombin, able to convert fibrinogen into fibrin; to activate coagulation factor XIII, important for stabilizing the fibrin clot; to amplify the coagulation process by activating cofactors V and VIII and factor XI and to activate platelets. Moreover, recent studies have shown that monocytes were able to express coagulation factor XIII in response to stimulation by proinflammatory cytokines [75] and to secrete tissue-type plasminogen activator, a serine

protease that converts plasminogen into plasmin leading to the degradation of fibrin clots, playing a key role in fibrinolysis [76]. Monocytes can be activated by pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or damage-associated molecular patterns (DAMPs) and release tissue factor-bearing microvesicles [77]. Platelets and neutrophils also have a major role in immunothrombosis [78,79]. Many studies showed that an aberrant immunothrombosis process could contribute to thrombus formation in inflammatory diseases such as atherosclerosis [80]. In the AVS context, this process could be involved in disease progression and the hemostasis complications observed after TAVR.

7. Monocyte Subsets and Cardiovascular Diseases

Variations in the repartition of the monocyte subsets have been reported several times in diverse conditions, either as a protective mechanism or as taking part in the pathological process, such as in infections, cancers, autoimmune or inflammatory diseases [14], although the finer details of their involvement are not yet fully understood. Interestingly, the repartition of the circulating monocyte subsets has been identified as a predictive prognosis marker in various cardiovascular diseases caused by atherosclerosis such as coronary artery disease, stroke or peripheral arterial disease [12,81]. These studies frequently reported associations between an increase of intermediate monocyte levels and the severity or complications of the diseases [81–84]. For example, in a prospective cohort study of 951 subjects referred for elective coronary angiography, Rogacev et al. [85] showed that a higher level of intermediate monocytes at the inclusion was predictive of any adverse cardiovascular events (cardiovascular death, acute myocardial infarction or non-hemorrhagic stroke), after adjustment for confounders such as age, sex, diabetes, hypertension, smoking, high-density-

lipoprotein cholesterol, CRP and total leukocyte count, with a mean follow-up of 3 years. Moreover, some studies highlighted that elevated intermediate monocyte levels play a key role in the growth and stability of atherosclerotic lesions [86,87].

8. Monocyte Subsets and Aortic Valve Stenosis

While data accumulate on the key role of monocytes/macrophages in AVS and the similarity in many aspects of AVS and atherosclerosis, very few studies have reported the circulating levels of total monocyte and of monocyte subsets in AVS patients. Shimoni et al. [88] compared a cohort of 54 patients with significant AVS (10 with moderate and 44 with severe AVS) to 33 patients with similar cardiovascular risk factors and no valvular disease. They observed that patients with AVS had increased levels of total circulating monocytes compared to controls with an inverse correlation between monocyte level and aortic valve area. Similarly, Efe et al. [89] observed in a cohort of 178 patients with a diagnosis of AVS (111 mild-to-moderate patients and 67 severe patients) and 139 age- and gender-matched without AVS controls, higher monocyte levels in severe AVS patients compared to mild-to-moderate patients and higher monocyte levels in mild-to-moderate AVS patients compared to controls. Moreover, they observed that the lymphocyte to monocyte ratio was lower in the group with severe AVS than in the group with mild-to-moderate AVS and lower in this group than in the control group; and that the lymphocyte to monocyte ratio was independently related to the severity of AVS (mean gradient). In both studies, they did not analyze the monocyte subsets. Hewing et al. [90] showed, in a cohort of 100 AVS patients compared to AVS free controls, that absolute levels of circulating intermediate monocytes were increased in severe AVS while absolute levels of circulating classical and non-classical monocyte subsets did not differ

between both groups. Interestingly, the difference of intermediate monocyte levels between both groups was independent of age, sex, body mass index, low-density-lipoprotein cholesterol, N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, New York Heart Association (NYHA) functional class and creatinine levels.

9. Monocyte Subsets and Transcatheter Aortic Valve Replacement

A few teams were interested in the variation of the monocyte subset levels before and after TAVR that may have been induced by the sudden change of hemodynamic conditions. At this time, according to the best of our knowledge, only four studies reported these variations or associated the levels of a pre- or postprocedural subset with outcome after TAVR (Table 2). First, Hewing et al. [91] compared the monocyte subsets before aortic valve replacement versus 3 and 6 months after, in a cohort of 69 patients with severe AVS (44 TAVR and 25 surgery). They observed, in both groups (TAVR and surgery), no change in monocyte counts at 3 and 6 months after aortic valve replacement compared with baseline and a decrease of absolute intermediate monocyte levels at 6 months after surgery procedure and earlier after TAVR (at 3 and 6 months.) Absolute classical and non-classical monocytes remained stable in both groups as well as inflammatory markers (CRP, IL-6, TNF- α). Then, Neuser et al. [92] compared the monocyte subsets before TAVR versus day 4 to 7 after in a cohort of 57 patients. No difference in total absolute monocytes, classical and non-classical monocyte levels was observed, whereas they reported a decline of absolute intermediate monocyte levels after TAVR. Moreover, high levels of absolute intermediate monocytes prior to TAVR were associated with worse cardiac function and lower probability to reach an improvement in NYHA functional class 3 months after TAVR. In this study, CRP increased after TAVR but was

not correlated with intermediate monocyte levels at any point. More recently, Pfluecke et al. [93] compared the three monocyte subsets on the day before, 24 h and 7 days after TAVR with the mortality at 3 months in a cohort of 120 severe AVS patients. They observed that non-classical and intermediate monocyte levels were higher before TAVR in patients who died within 3 months after TAVR compared to survivors. At 24 h and 7 days after TAVR, no significant difference was observed for the three monocyte subsets between survivors and non-survivors, except for classical monocytes the day after TAVR, higher in survivors. Interestingly, the intermediate monocyte level measured before TAVR remains an independent predictor for 3-month mortality, after adjustment with age, left ventricular ejection fraction, circulating CRP and IL-8 and CD11b-expression on monocytes, marker of cell activation. In this cohort, Cybularz et al. [94] investigated the association of frailty with monocyte subsets and observed higher absolute intermediate monocyte levels in 28 frail patients compared to not-frail patients. Moreover, intermediate monocyte levels were independent predictors for post-TAVR 6 months mortality after adjustment for frailty and CRP. Finally, Hoffmann et al. [95] compared the monocyte subsets before TAVR versus immediately, 24 h and 3 days after TAVR in a cohort of 129 patients. They observed a significant elevation of classical and intermediate monocytes at 24 h followed by an elevation of non-classical monocytes 3 days after TAVR. Moreover, they reported that levels of intermediate monocytes tended to be predictive of 12 month mortality and that non-classical monocytes measured immediately after TAVR were associated with 12 month all-cause mortality, even after the exclusion of those patients dying within the first 30 days after TAVR. It is very difficult to compare these studies as the times of study of the monocyte subset repartitions in the post-TAVR procedure as well as the follow-up periods and type of analyzed

adverse events were not the same. However, all these studies reported an impact of the TAVR procedure on intermediate monocyte levels with an earlier increase in post-procedural and then a decrease under baseline a few days and months after TAVR.

The mechanisms involved in the modulation of circulating intermediate monocyte levels during a TAVR procedure remain speculative. The TAVR procedure results in sudden changes in wall shear stress and flow turbulence associated with a proinflammatory response. It can be hypothesized that increased levels of circulating intermediate monocytes quickly after TAVR are the result of interplay between significant hemodynamic disturbances and inflammation response. To go deeper into the comprehension of the shear stress impact on monocyte function, Baratchi et al. [96] recently compared the activation status of monocytes in patients with severe AVS before TAVR, i.e., under high shear stress, and after TAVR, i.e., normal shear stress. They showed that monocytes were more activated before TAVR in comparison with 1 month after TAVR, with a higher phagocytic activity, greater adhesive capacity and oxidized low-density-lipoprotein uptake and higher monocyte expression of proinflammatory cytokines (IL-6, interferon β 1, TNF α). These results were confirmed in a microfluidic system recapitulating the shear conditions observed before and after TAVR. Interestingly, they identified the mechano-sensitive calcium channel receptor Piezo-1 as an essential mediator of the shear-stress responsive mechanoreceptor in human monocytes and observed that the expression of this receptor on monocytes is downregulated after TAVR. Thus, besides its hemodynamic benefits, a TAVR procedure also induces beneficial anti-inflammatory effects. Targeting Piezo-1 with pharmacological agents to inhibit monocyte activation may constitute a new therapeutic perspective in AVS. Interestingly, in all studies on monocyte subsets and TAVR, the authors reported an association between pre- or

postprocedural levels of intermediate monocytes and TAVR deleterious complications at 3, 6 or 12 months. These results are in line with previous findings of higher major cardiovascular events depending on elevated intermediate monocyte levels [81] but these observational studies cannot answer the question whether the modulation of intermediate monocyte levels after TAVR represent a causal factor for outcomes or just a consequence of the procedure itself. Additional work is needed to understand how these modulations may influence later clinical events [12]. Moreover, one of the main limitations of these studies on TAVR patients is their small sample size. All findings should be confirmed in larger and longitudinal studies before considering intermediate monocyte levels as a usual risk marker and as a possible target for therapeutics to decrease AVS progression and the rate of complications associated with TAVR procedure. Finally, it should be noted that the impact of monocyte subsets on thrombosis and bleeding complications occurring after TAVR have not yet been described, although these complications are frequent in post-TAVR patients and monocytes are key players in the process of thromboinflammation.

10. Transcatheter Aortic Valve Replacement, Monocytes and Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential

Clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), defined by the presence of acquired somatic mutations in hematopoietic stem cells without other hematologic abnormalities, is a novel age-related risk factor for coronary artery calcification and atherosclerotic cardiovascular morbidity and mortality, independent of traditional risk factors [97–99]. Mechanistically, experimental approaches based on murine models indicate that this premalignant disorder induced an accelerated atherogenesis toward a proinflammatory and

profibrotic state driven by clonally derived circulating monocytes and macrophages infiltrating atherosclerotic lesions [100–103]. Gene mutations in DNA-methyltransferase 3A (*DNMT3A*) and Tet-methylcytosine dioxygenase 2 (*TET2*) are the most frequently identified variants among patients with CHIP. Mas-Peiro et al. assessed the incidence of somatic CHIP-driver mutations in these two genes in 279 patients with critical AVS undergoing TAVR and their association with circulating monocyte subset levels evaluated before TAVR and with all-cause mortality [104]. They reported the presence of somatic *DNMT3A*- and *TET2*-CHIP-driver mutations with a variant allele frequency $\geq 2\%$ in a third of patients with an incidence that increases with age (from 25% in patients aged 55–79 years to 53% in those aged 90–100 years) and a three-fold increase of death risk over a median 8-month follow-up period after TAVR in patients with *DNMT3A* or *TET2* mutations compared with a group of age-matched patients without *DNMT3A* and *TET2* mutations. They also observed in a subset of *TET2*-CHIP patients, an increase of non-classical monocyte levels compared to patients without *DNMT3A* and *TET2* mutations. As non-classical monocytes are known to secrete high levels of inflammatory cytokines [105], this data supports the notion that an inflammatory mechanism may be critical to poor outcomes in TAVR. Results of this study are strengthened by another study which observed, by using single-cell RNA sequencing, a higher expression of mediators of inflammation, IL-1 β , IL-6 receptor and NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) inflammasome complex, in the monocytes from eight patients with severe AVS and *DNMT3A* or *TET2* mutations compared to age-matched healthy control participants without *DNMT3A* and *TET2* mutations [106]. As these studies were limited to *DNMT3A* and *TET2* mutations, the effects of mutations in other driver genes on monocyte subset repartition and

phenotype and the outcomes of patients with severe AVS who underwent TAVR need to be investigated.

11. Preventive Therapy to Reduce Inflammation in Context of Transcatheter Aortic Valve Replacement

As we know that a systemic inflammation response occurs after a TAVR procedure in approximately 50% of patients and that monocytes seem to play a key role in this response, introducing a preventive anti-inflammatory therapy targeting monocytes should be discussed. Recent studies provided evidence that modulating the monocyte phenotype and inflammatory processes in pre-clinical animal models of atherosclerosis could be effective in reducing lesion size, and in patients with cardiovascular diseases in reducing cardiovascular events and improving clinical outcomes [107,108]. The most accomplished example is canakinumab, a monoclonal antibody that inhibits IL-1 β , a proinflammatory cytokine predominantly synthesized by monocytes and macrophages. A large clinical trial, Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS) has proved the effectiveness of this antibody in reducing the risk of cardiovascular event disease, particularly in patients with elevated markers of inflammation [109,110]. Other therapeutic approaches targeting monocytes in atherosclerosis context have been proposed, for example, by blocking C-C motif chemokine receptor 2 (CCR2)/C-C motif chemokine ligand 2 (CCL2)-mediated monocyte recruitment using small-interfering RNAs (siRNAs), monoclonal antibodies, CCR2 antagonists, pharmacological inhibition and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibitors [111,112]. Moreover, in a natural way, polyphenols were demonstrated to have beneficial effects on the cardiovascular system. They are mostly present in fruits and

vegetables and their actions have been studied several times [113]. Anthocyanidins (present in berries, cereals, red wine or cabbage) can reduce monocyte cell adhesion to endothelial cells by decreasing the level of adhesion molecules such as vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and inter cellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) as well as proinflammatory mediators such as IL-6 and MCP-1 in monocytes [114]. In a more technological way, nanoparticles represent novel sources of treatment to target cardiovascular diseases [115]. Nanoparticle-mediated targeted delivery of specific drugs into circulating monocytes has been studied in a model of atherosclerosis in mice [116] and it inhibited macrophage activation and atherosclerotic plaque rupture.

Statins were proven to reduce morbidity and to improve overall survival in patients at high risk of cardiovascular mortality by reducing the levels of low density lipoprotein-cholesterol, as well as regressing or stabilizing coronary atheromatous plaques [117,118], but they did not seem to reduce cardiovascular events related to AVS [119]. It should also be noted that data on the effects of statins on blood monocyte subset repartition are scarce and controversial [120]. However, in the context of patients undergoing TAVR, statin use was associated with a reduced all-cause mortality compared with no statin use [121,122]. Sasaki et al. [123] also studied the use of anti-atherosclerotic therapy, combining simultaneously antiplatelet agents, statins and renin aldosterone system inhibitors, prescribed after TAVR and showed that patients with this anti-atherosclerotic therapy had a better 2-year-survival rate than patients without it.

Preventive therapy could be discussed in patients who have a pre-existing proinflammatory comorbidity, which could worsen TAVR consequences. For example, the presence of diabetes is associated with poor outcome after TAVR with a higher risk of stroke [124] or 2-year

mortality [125]. As we said earlier, the mechano-sensitive calcium channel receptor Piezo-1, highly expressed on the monocyte surface, has been identified as an essential mediator of shear stress and inflammation [96]. It could be a novel therapeutic target in TAVR.

12. Conclusions

In the end, very few teams reported the monocyte subset repartition during TAVR but they all confirmed that intermediate monocyte levels were impacted by the instantaneous change of blood flow pulsatility occurring during the TAVR procedure in patients with severe AVS, now considered as an active and chronic inflammatory disease. In addition, as previously described for other cardiovascular diseases, intermediate monocyte levels (measured before or after TAVR) seem to be associated with early mortality or worse cardiac function after TAVR. This biomarker could be used as a predictive biomarker for TAVR complications and constitute a decision-making aid in the management of the growing population of candidates for TAVR, but, before this parameter can be used in clinical practice, these data need to be reinforced. Moreover, even though intermediate monocyte level modulation has been reported in TAVR procedures and their prognostic values have been described in some publications, the question, whether intermediate monocytes represent a reflection or rather contribute to the TAVR outcomes remains essentially unanswered. Proving the causal role of intermediate monocytes in TAVR complications in patients with severe AVS requires large prospective and long-term studies with longitudinal assessments of monocyte subsets and is an essential step towards understanding the mechanisms involved in TAVR complications and to propose, in the future, therapeutic targets of interest in the AVS and TAVR context.

Author Contributions: Conceptualization, F.L., S.S. and A.D.; writing—original draft preparation, F.L. and A.D.; writing—review and editing, M.R., B.S., E.V.B. and S.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: B.S. is supported by grants from the Fondation Leducq convention 16CVD01 “Defining and targeting epigenetic pathways in monocytes and macrophages that contribute to cardiovascular disease”, the European Genomic Institute for Diabetes (EGID, ANR-10-LABX-0046) and is a recipient of an Advanced ERC Grant (694717).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Goody, P.R.; Hosen, M.R.; Christmann, D.; Niepmann, S.T.; Zietzer, A.; Adam, M.; Bönner, F.; Zimmer, S.; Nickenig, G.; Jansen, F. Aortic Valve Stenosis: From Basic Mechanisms to Novel Therapeutic Targets. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020, *40*, 885–900.
2. Passos, L.S.A.; Lupieri, A.; Becker-Greene, D.; Aikawa, E. Innate and adaptive immunity in cardiovascular calcification. *Atherosclerosis* 2020, *306*, 59–67.
3. Grim, J.C.; Aguado, B.A.; Vogt, B.J.; Batan, D.; Andrichik, C.L.; Schroeder, M.E.; Gonzalez-Rodriguez, A.; Yavitt, F.M.; Weiss, R.M.; Anseth, K.S. Secreted Factors From Proinflammatory Macrophages Promote an Osteoblast-Like Phenotype in Valvular Interstitial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2020, *40*, e296–e308.
4. Otto, C.M.; Kuusisto, J.; Reichenbach, D.D.; Gown, A.M.; O’Brien, K.D. Characterization of the early lesion of “degenerative” valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies. *Circulation* 1994, *90*, 844–853.
5. Freeman, R.V.; Otto, C.M. Spectrum of Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation* 2005, *111*, 3316–3326.
6. Zebhi, B.; Lazkani, M.; Bark, D. Calcific Aortic Stenosis—A Review on Acquired Mechanisms of the Disease and Treatments. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021, *8*, 734175.

7. Bian, W.; Wang, Z.; Sun, C.; Zhang, D.-M. Pathogenesis and Molecular Immune Mechanism of Calcified Aortic Valve Disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021, *8*, 765419.
8. Vahanian, A.; Beyersdorf, F.; Praz, F.; Milojevic, M.; Baldus, S.; Bauersachs, J.; Capodanno, D.; Conradi, L.; De Bonis, M.; De Paulis, R.; et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur. Heart J.* 2022, *43*, 561–632.
9. Otto, C.M.; Nishimura, R.A.; Bonow, R.O.; Carabello, B.A.; Erwin, J.P.; Gentile, F.; Jneid, H.; Krieger, E.V.; Mack, M.; McLeod, C.; et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients with Valvular Heart Disease: Executive Summary. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2021, *77*, 450–500.
10. Rouleau, S.G.; Brady, W.J.; Koyfman, A.; Long, B. Transcatheter aortic valve replacement complications: A narrative review for emergency clinicians. *Am. J. Emerg. Med.* 2022, *56*, 77–86.
11. Pieniak, K.; Jędrzejczyk, S.; Domaszko, O.; Grodecki, K.; Rymuza, B.; Huczek, Z.; Kochman, J.; Filipiak, K.J.; Gąsecka, A. Predictors and Biomarkers of Subclinical Leaflet Thrombosis after Transcatheter Aortic Valve Implantation. *J. Clin. Med.* 2020, *9*, 3742.
12. Williams, H.; Mack, C.D.; Li, S.C.H.; Fletcher, J.P.; Medbury, H.J. Nature versus Number: Monocytes in Cardiovascular Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 9119.
13. van der Vorst, E.P.C.; Weber, C. Novel Features of Monocytes and Macrophages in Cardiovascular Biology and Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019, *39*, e30–e37.
14. Ożańska, A.; Szymczak, D.; Rybka, J. Pattern of human monocyte subpopulations in health and disease. *Scand. J. Immunol.* 2020, *92*, e12883.
15. Idzkowska, E.; Eljaszewicz, A.; Miklasz, P.; Musiał, W.J.; Tycinska, A.M.; Moniuszko, M. The Role of Different Monocyte Subsets in the Pathogenesis of Atherosclerosis and Acute Coronary Syndromes. *Scand. J. Immunol.* 2015, *82*, 163–173.
16. Mehu, M.; Narasimhulu, C.A.; Singla, D.K. Inflammatory Cells in Atherosclerosis. *Antioxidants* 2022, *11*, 233.
17. Stewart, B.F.; Siscovick, D.; Lind, B.K.; Gardin, J.M.; Gottdiener, J.S.; Smith, V.E.; Kitzman, D.W.; Otto, C.M. Clinical Factors Associated with Calcific Aortic Valve Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1997, *29*, 630–634.
18. Lindman, B.R.; Clavel, M.-A.; Mathieu, P.; Lung, B.; Lancellotti, P.; Otto, C.M.; Pibarot, P. Calcific aortic stenosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2016, *2*, 16006.

19. Coffey, S.; Cox, B.; Williams, M.J.A. The Prevalence, Incidence, Progression, and Risks of Aortic Valve Sclerosis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014, *63*, 2852–2861.
20. Hansson, G.K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, *352*, 1685–1695.
21. Zhang, M.; Liu, X.; Zhang, X.; Song, Z.; Han, L.; He, Y.; Xu, Z. MicroRNA-30b is a multifunctional regulator of aortic valve interstitial cells. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2014, *147*, 1073–1080.e2.
22. Rajamannan, N.M. Calcific Aortic Stenosis: A Disease Ready for Prime Time. *Circulation* 2006, *114*, 2007–2009.
23. Weston, M.W.; LaBorde, D.V.; Yoganathan, A.P. Estimation of the Shear Stress on the Surface of an Aortic Valve Leaflet. *Ann. Biomed. Eng.* 1999, *27*, 572–579.
24. Balachandran, K.; Sucusky, P.; Yoganathan, A.P. Hemodynamics and Mechanobiology of Aortic Valve Inflammation and Calcification. *Int. J. Inflamm.* 2011, *2011*, 263870.
25. Bäck, M.; Gasser, T.C.; Michel, J.-B.; Caligiuri, G. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc. Res.* 2013, *99*, 232–241.
26. Van Ooij, P.; Markl, M.; Collins, J.D.; Carr, J.C.; Rigsby, C.; Bonow, R.O.; Malaisrie, S.C.; McCarthy, P.M.; Fedak, P.W.M.; Barker, A.J. Aortic Valve Stenosis Alters Expression of Regional Aortic Wall Shear Stress: New Insights from a 4-Dimensional Flow Magnetic Resonance Imaging Study of 571 Subjects. *J. Am. Heart Assoc.* 2017, *6*, e005959.
27. Pareti, F.I.; Lattuada, A.; Bressi, C.; Zanobini, M.; Sala, A.; Steffan, A.; Ruggeri, Z.M. Proteolysis of von Willebrand Factor and Shear Stress–Induced Platelet Aggregation in Patients with Aortic Valve Stenosis. *Circulation* 2000, *102*, 1290–1295.
28. Van Belle, E.; Vincent, F.; Rauch, A.; Casari, C.; Jeanpierre, E.; Loobuyck, V.; Rosa, M.; Delhayé, C.; Spillemaeker, H.; Paris, C.; et al. von Willebrand Factor and Management of Heart Valve Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2019, *73*, 1078–1088.
29. Siediecki, C.; Lestini, B.; Kottke-Marchant, K.; Eppell, S.; Wilson, D.; Marchant, R. Shear-dependent changes in the three-dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood* 1996, *88*, 2939–2950.
30. Tsai, H.; Sussman, I.; Nagel, R. Shear stress enhances the proteolysis of von Willebrand factor in normal plasma. *Blood* 1994, *83*, 2171–2179.

31. Vincentelli, A.; Susen, S.; Le Tourneau, T.; Six, I.; Fabre, O.; Juthier, F.; Bauters, A.; Decoene, C.; Goudemand, J.; Prat, A.; et al. Acquired von Willebrand syndrome in aortic stenosis. *N. Engl. J. Med.* 2003, *349*, 343–349.
32. Warkentin, T.E.; Moore, J.C.; Morgan, D.G. Aortic stenosis and bleeding gastrointestinal angiodysplasia: Is acquired von Willebrand's disease the link? *Lancet Lond. Engl.* 1992, *340*, 35–37.
33. Heyde, E. Gastrointestinal Bleeding in Aortic Stenosis. *N. Engl. J. Med.* 1958, *259*, 196–196.
34. Love, J.; Jahnke, E.; Zacharias, D.; Davidson, W.; Kidder, W.; Luan, L. Calcific Aortic Stenosis and Gastrointestinal Bleeding. *N. Engl. J. Med.* 1980, *302*, 968–968.
35. Godino, C.; Lauretta, L.; Pavon, A.G.; Mangieri, A.; Viani, G.; Chieffo, A.; Galaverna, S.; Latib, A.; Montorfano, M.; Cappelletti, A.; et al. Heyde's Syndrome Incidence and Outcome in Patients Undergoing Transcatheter Aortic Valve Implantation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, *61*, 687–689.
36. Saad, R.A.; Lwaleed, B.A.; Kazmi, R.S. Gastrointestinal Bleeding and Aortic Stenosis (Heyde Syndrome): The Role of Aortic Valve Replacement: Gastrointestinal Bleeding and Aortic Stenosis. *J. Card. Surg.* 2013, *28*, 414–416.
37. Leon, M.B.; Smith, C.R.; Mack, M.; Miller, D.C.; Moses, J.W.; Svensson, L.G.; Tuzcu, E.M.; Webb, J.G.; Fontana, G.P.; Makkar, R.R.; et al. Transcatheter aortic-valve implantation for aortic stenosis in patients who cannot undergo surgery. *N. Engl. J. Med.* 2010, *363*, 1597–1607.
38. Van Belle, E.; Rauch, A.; Vincent, F.; Robin, E.; Kibler, M.; Labreuche, J.; Jeanpierre, E.; Levade, M.; Hurt, C.; Rouse, N.; et al. Von Willebrand Factor Multimers during Transcatheter Aortic-Valve Replacement. *N. Engl. J. Med.* 2016, *375*, 335–344.
39. Rodés-Cabau, J.; Dauerman, H.L.; Cohen, M.G.; Mehran, R.; Small, E.M.; Smyth, S.S.; Costa, M.A.; Mega, J.L.; O'Donoghue, M.L.; Ohman, E.M.; et al. Antithrombotic Treatment in Transcatheter Aortic Valve Implantation: Insights for Cerebrovascular and Bleeding Events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2013, *62*, 2349–2359.
40. Van Belle, E.; Hengstenberg, C.; Lefevre, T.; Kupatt, C.; Debry, N.; Husser, O.; Pontana, F.; Kuchcinski, G.; Deliargyris, E.N.; Mehran, R.; et al. Cerebral Embolism during Transcatheter Aortic Valve Replacement: The BRAVO-3 MRI Study. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2016, *68*, 589–599.
41. Guedeney, P.; Mehran, R.; Collet, J.-P.; Claessen, B.E.; ten Berg, J.; Dangas, G.D. Antithrombotic Therapy after Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2019, *12*, e007411.

42. Kapadia, S.; Agarwal, S.; Miller, D.C.; Webb, J.G.; Mack, M.; Ellis, S.; Herrmann, H.C.; Pichard, A.D.; Tuzcu, E.M.; Svensson, L.G.; et al. Insights into Timing, Risk Factors, and Outcomes of Stroke and Transient Ischemic Attack after Transcatheter Aortic Valve Replacement in the PARTNER Trial. *Circ. Cardiovasc. Interv.* 2016, *9*, e002981.
43. Kahlert, P.; Knipp, S.C.; Schlamann, M.; Thielmann, M.; Al-Rashid, F.; Weber, M.; Johansson, U.; Wendt, D.; Jakob, H.G.; Forsting, M.; et al. Silent and Apparent Cerebral Ischemia after Percutaneous Transfemoral Aortic Valve Implantation: A Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging Study. *Circulation* 2010, *121*, 870–878.
44. Uriel, N.; Pak, S.-W.; Jorde, U.P.; Jude, B.; Susen, S.; Vincentelli, A.; Ennezat, P.-V.; Cappleman, S.; Naka, Y.; Mancini, D. 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.* 2010, *56*, 1207–1213.
45. Van Belle, E.; Rauch, A.; Vincentelli, A.; Jeanpierre, E.; Legendre, P.; Juthier, F.; Hurt, C.; Banfi, C.; Rouse, N.; Godier, A.; et al. von Willebrand Factor as a Biological Sensor of Blood Flow to Monitor Percutaneous Aortic Valve Interventions. *Circ. Res.* 2015, *116*, 1193–1201.
46. Sawaya, F.; Jørgensen, T.H.; Søndergaard, L.; De Backer, O. Transcatheter Bioprosthetic Aortic Valve Dysfunction: What We Know So Far. *Front. Cardiovasc. Med.* 2019, *6*, 145.
47. Egbe, A.C.; Pislaru, S.V.; Pellikka, P.A.; Poterucha, J.T.; Schaff, H.V.; Maleszewski, J.J.; Connolly, H.M. Bioprosthetic Valve Thrombosis Versus Structural Failure: Clinical and Echocardiographic Predictors. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015, *66*, 2285–2294.
48. Makkar, R.R.; Thourani, V.H.; Mack, M.J.; Kodali, S.K.; Kapadia, S.; Webb, J.G.; Yoon, S.-H.; Trento, A.; Svensson, L.G.; Herrmann, H.C.; et al. Five-Year Outcomes of Transcatheter or Surgical Aortic-Valve Replacement. *N. Engl. J. Med.* 2020, *382*, 799–809.
49. Wolff, G.; Shamekhi, J.; Al-Kassou, B.; Tabata, N.; Parco, C.; Klein, K.; Maier, O.; Sedaghat, A.; Polzin, A.; Sugiura, A.; et al. Risk modeling in transcatheter aortic valve replacement remains unsolved: An external validation study in 2946 German patients. *Clin. Res. Cardiol.* 2021, *110*, 368–376.
50. Cockburn, J.; Dooley, M.; de Belder, A.; Trivedi, U.; Hildick-Smith, D. A comparison between surgical risk scores for predicting outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation. *J. Cardiovasc. Surg.* 2017, *58*, 467–472.

51. Lindman, B.R.; Breyley, J.G.; Schilling, J.D.; Vatterott, A.M.; Zajarias, A.; Maniar, H.S.; Damiano, R.J.; Moon, M.R.; Lawton, J.S.; Gage, B.F.; et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress in patients with aortic stenosis undergoing valve replacement. *Heart Br. Card. Soc.* 2015, *101*, 1382–1388.
52. Imai, K.; Okura, H.; Kume, T.; Yamada, R.; Miyamoto, Y.; Kawamoto, T.; Watanabe, N.; Neishi, Y.; Toyota, E.; Yoshida, K. C-Reactive protein predicts severity, progression, and prognosis of asymptomatic aortic valve stenosis. *Am. Heart J.* 2008, *156*, 713–718.
53. Kahraman, S.; Can Dogan, A.; Demirci, G.; Riza Demir, A.; Yilmaz, E.; Zencirkiran Agus, H.; Kemal Kalkan, A.; Uzun, F.; Erturk, M. The Prognostic Value of C-reactive Protein to Albumin Ratio in Patients with Isolated Degenerative Aortic Valve Stenosis Undergoing Surgical Aortic Valve Replacement. *Braz. J. Cardiovasc. Surg.* 2020, *35*, 299–306.
54. Takagi, H.; Kuno, T.; Hari, Y.; Nakashima, K.; Yokoyama, Y.; Ueyama, H.; Ando, T.; ALICE (All-Literature Investigation of Cardiovascular Evidence) Group. Prognostic impact of baseline C-reactive protein levels on mortality after transcatheter aortic valve implantation. *J. Card. Surg.* 2020, *35*, 974–980.
55. Hioki, H.; Watanabe, Y.; Kozuma, K.; Yamamoto, M.; Naganuma, T.; Araki, M.; Tada, N.; Shirai, S.; Yamanaka, F.; Higashimori, A.; et al. Effect of Serum C-Reactive Protein Level on Admission to Predict Mortality after Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am. J. Cardiol.* 2018, *122*, 294–301.
56. Navani, R.V.; Quine, E.J.; Duffy, S.J.; Htun, N.M.; Nanayakkara, S.; Walton, A.S.; Stub, D. Relation of Preprocedure Platelet-to-Lymphocyte Ratio and Major Adverse Cardiovascular Events Following Transcatheter Aortic Valve Implantation for Aortic Stenosis. *Am. J. Cardiol.* 2022, *163*, 65–70.
57. Li, H.; Zhou, Y.; Ma, Y.; Han, S.; Zhou, L. The prognostic value of the platelet-to-lymphocyte ratio in acute coronary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Kardiol. Pol.* 2017, *75*, 666–673.
58. Condado, J.F.; Junpaparp, P.; Binongo, J.N.; Lasanajak, Y.; Witzke-Sanz, C.F.; Devireddy, C.; Leshnower, B.; Mavromatis, K.; Stewart, J.; Guyton, R.; et al. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) can risk stratify patients in transcatheter aortic-valve replacement (TAVR). *Int. J. Cardiol.* 2016, *223*, 444–449.

59. Tosu, A.; Cinar, T.; Guler, A.; Kahraman, S.; Gurbak, I. The predictive value of platelet to lymphocyte ratio for procedural complications and mid-term mortality in aortic stenosis patients who underwent a transcatheter aortic valve implantation. *Ann. Med. Res.* 2019, *26*, 537–541.
60. Khalil, C.; Pham, M.; Sawant, A.C.; Sinibaldi, E.; Bhardwaj, A.; Ramanan, T.; Qureshi, R.; Khan, S.; Ibrahim, A.; Gowda, S.N.; et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts heart failure readmissions and outcomes in patients undergoing transcatheter aortic valve replacement. *Indian Heart J.* 2018, *70*, S313–S318.
61. Koskinas, K.C.; O’Sullivan, C.J.; Heg, D.; Praz, F.; Stortecky, S.; Pilgrim, T.; Buellesfeld, L.; Jüni, P.; Windecker, S.; Wenaweser, P. Effect of B-type Natriuretic Peptides on Long-Term Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am. J. Cardiol.* 2015, *116*, 1560–1565.
62. Krau, N.-C.; Lünstedt, N.-S.; Freitag-Wolf, S.; Brehm, D.; Petzina, R.; Lutter, G.; Bramlage, P.; Dempfle, A.; Frey, N.; Frank, D. Elevated growth differentiation factor 15 levels predict outcome in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation: GDF15 predicts outcome in TAVI patients. *Eur. J. Heart Fail.* 2015, *17*, 945–955.
63. Sinning, J.-M.; Wollert, K.C.; Sedaghat, A.; Widera, C.; Radermacher, M.-C.; Descoups, C.; Hammerstingl, C.; Weber, M.; Stundl, A.; Ghanem, A.; et al. Risk scores and biomarkers for the prediction of 1-year outcome after transcatheter aortic valve replacement. *Am. Heart J.* 2015, *170*, 821–829.
64. Oury, C.; Nchimi, A.; Lancellotti, P.; Bergler-Klein, J. Can Blood Biomarkers Help Predicting Outcome in Transcatheter Aortic Valve Implantation? *Front. Cardiovasc. Med.* 2018, *5*, 31.
65. Ingersoll, M.A.; Platt, A.M.; Potteaux, S.; Randolph, G.J. Monocyte trafficking in acute and chronic inflammation. *Trends Immunol.* 2011, *32*, 470–477.
66. Ziegler-Heitbrock, L.; Hofer, T.P. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front. Immunol.* 2013, *4*, 23.
67. Boyette, L.B.; Macedo, C.; Hadi, K.; Elinoff, B.D.; Walters, J.T.; Ramaswami, B.; Chalasani, G.; Taboas, J.M.; Lakkis, F.G.; Metes, D.M. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS ONE* 2017, *12*, e0176460.
68. Connaughton, E.P.; Naicker, S.; Hanley, S.A.; Slevin, S.M.; Eykelenboom, J.K.; Lowndes, N.F.; O’Brien, T.; Ceredig, R.; Griffin, M.D.; Denny, M.C. Phenotypic and functional heterogeneity of human intermediate monocytes based on HLA-DR expression. *Immunol. Cell Biol.* 2018, *96*, 742–758.

69. Thomas, G.; Tacke, R.; Hedrick, C.C.; Hanna, R.N. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2015, *35*, 1306–1316.
70. Cormican, S.; Griffin, M.D. Human Monocyte Subset Distinctions and Function: Insights from Gene Expression Analysis. *Front. Immunol.* 2020, *11*, 1070.
71. Cros, J.; Cagnard, N.; Woollard, K.; Patey, N.; Zhang, S.-Y.; Senechal, B.; Puel, A.; Biswas, S.K.; Moshous, D.; Picard, C.; et al. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity* 2010, *33*, 375–386.
72. Wong, K.L.; Tai, J.J.-Y.; Wong, W.-C.; Han, H.; Sem, X.; Yeap, W.-H.; Kourilsky, P.; Wong, S.-C. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood* 2011, *118*, e16–e31.
73. Zawada, A.M.; Rogacev, K.S.; Rotter, B.; Winter, P.; Marell, R.-R.; Fliser, D.; Heine, G.H. SuperSAGE evidence for CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 2011, *118*, e50–e61.
74. Maugeri, N.; Brambilla, M.; Camera, M.; Carbone, A.; Tremoli, E.; Donati, M.B.; Gaetano, G.D.; Cerletti, C. Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation. *J. Thromb. Haemost.* 2006, *4*, 1323–1330.
75. Alshehri, F.S.M.; Whyte, C.S.; Tuncay, A.; Williams, M.-L.; Wilson, H.M.; Mutch, N.J. Monocytes Expose Factor XIII-A and Stabilize Thrombi against Fibrinolytic Degradation. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 6591.
76. Seillier, C.; Hélie, P.; Petit, G.; Vivien, D.; Clemente, D.; Le Mauff, B.; Docagne, F.; Toutirais, O. Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response. *Cell. Immunol.* 2022, *371*, 104451.
77. Gaertner, F.; Massberg, S. Blood coagulation in immunothrombosis—At the frontline of intravascular immunity. *Semin. Immunol.* 2016, *28*, 561–569.
78. Darbousset, R.; Thomas, G.M.; Mezouar, S.; Frère, C.; Bonier, R.; Mackman, N.; Renné, T.; Dignat-George, F.; Dubois, C.; Panicot-Dubois, L. Tissue factor–positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 2012, *120*, 2133–2143.
79. Müller, I.; Klocke, A.; Alex, M.; Kotzsch, M.; Luther, T.; Morgenstern, E.; Zieseniss, S.; Zahler, S.; Preissner, K.; Engelmann, B. Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J.* 2003, *17*, 476–478.

80. Libby, P.; Simon, D.I. Inflammation and Thrombosis. *Circulation* 2001, *103*, 1718–1720.
81. Oh, E.S.; Na, M.; Rogers, C.J. The Association between Monocyte Subsets and Cardiometabolic Disorders/Cardiovascular Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Cardiovasc. Med.* 2021, *8*, 640124.
82. Zeynalova, S.; Bucksch, K.; Scholz, M.; Yahiaoui-Doktor, M.; Gross, M.; Löffler, M.; Melzer, S.; Tárnok, A. Monocyte subtype counts are associated with 10-year cardiovascular disease risk as determined by the Framingham Risk Score among subjects of the LIFE-Adult study. *PLoS ONE* 2021, *16*, e0247480.
83. Wildgruber, M.; Aschenbrenner, T.; Wendorff, H.; Czubba, M.; Glinzer, A.; Haller, B.; Schiemann, M.; Zimmermann, A.; Berger, H.; Eckstein, H.-H.; et al. The “Intermediate” CD14++CD16+ monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans. *Sci. Rep.* 2016, *6*, 39483.
84. Elchinova, E.; Teubel, I.; Roura, S.; Fernández, M.A.; Lupón, J.; Gálvez-Montón, C.; de Antonio, M.; Moliner, P.; Domingo, M.; Zamora, E.; et al. Circulating monocyte subsets and heart failure prognosis. *PLoS ONE* 2018, *13*, e0204074.
85. Rogacev, K.S.; Cremers, B.; Zawada, A.M.; Seiler, S.; Binder, N.; Ege, P.; Große-Dunker, G.; Heisel, I.; Hornof, F.; Jeken, J.; et al. CD14++CD16+ Monocytes Independently Predict Cardiovascular Events. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012, *60*, 1512–1520.
86. Ozaki, Y.; Imanishi, T.; Hosokawa, S.; Nishiguchi, T.; Taruya, A.; Tanimoto, T.; Kuroi, A.; Yamano, T.; Matsuo, Y.; Ino, Y.; et al. Association of Toll-Like Receptor 4 on Human Monocyte Subsets and Vulnerability Characteristics of Coronary Plaque as Assessed by 64-Slice Multidetector Computed Tomography. *Circ. J.* 2017, *81*, 837–845.
87. Imanishi, T.; Ikejima, H.; Tsujioka, H.; Kuroi, A.; Ishibashi, K.; Komukai, K.; Tanimoto, T.; Ino, Y.; Takeshita, T.; Akasaka, T. Association of monocyte subset counts with coronary fibrous cap thickness in patients with unstable angina pectoris. *Atherosclerosis* 2010, *212*, 628–635.
88. Shimoni, S.; Meledin, V.; Bar, I.; Fabricant, J.; Gandelman, G.; George, J. Circulating CD14(+) monocytes in patients with aortic stenosis. *J. Geriatr. Cardiol. JGC* 2016, *13*, 81–87.
89. Efe, T.H.; Gayretli Yayla, K.; Yayla, C.; Ertem, A.G.; Cimen, T.; Erken Pamukcu, H.; Bilgin, M.; Erat, M.; Dogan, M.; Yeter, E. Calcific aortic stenosis and its correlation with a novel inflammatory marker, the lymphocyte/monocyte ratio. *Rev. Port. Cardiol.* 2016, *35*, 573–578.

90. Hewing, B.; Au, S.C.-D.; Ludwig, A.; Ellerbroek, R.; van Dijck, P.; Hartmann, L.; Grubitzsch, H.; Giannini, C.; Laule, M.; Stangl, V.; et al. Severe Aortic Valve Stenosis in Adults is Associated with Increased Levels of Circulating Intermediate Monocytes. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 2017, *10*, 27–34.
91. Hewing, B.; Ellerbroek, R.; Au, S.; Stangl, V.; Dreger, H.; Laule, M.; Grubitzsch, H.; Knebel, F.; Baumann, G.; Ludwig, A.; et al. Levels of Circulating Intermediate Monocytes Decrease after Aortic Valve Replacement in Patients with Severe Aortic Stenosis. *Thromb. Haemost.* 2017, *117*, 2346–2355.
92. Neuser, J.; Galuppo, P.; Fraccarollo, D.; Willig, J.; Kempf, T.; Berliner, D.; Bauersachs, J.; Widder, J.D. Intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes decline after transcatheter aortic valve replacement and correlate with functional capacity and left ventricular systolic function. *PLoS ONE* 2017, *12*, e0183670.
93. Pfluecke, C.; Wydra, S.; Berndt, K.; Tarnowski, D.; Cybularz, M.; Jellinghaus, S.; Mierke, J.; Ende, G.; Poitz, D.M.; Barthel, P.; et al. Mon2-monocytes and increased CD-11b expression before transcatheter aortic valve implantation are associated with earlier death. *Int. J. Cardiol.* 2020, *318*, 115–120.
94. Cybularz, M.; Wydra, S.; Berndt, K.; Poitz, D.M.; Barthel, P.; Alkouri, A.; Heidrich, F.M.; Ibrahim, K.; Jellinghaus, S.; Speiser, U.; et al. Frailty is associated with chronic inflammation and pro-inflammatory monocyte subpopulations. *Exp. Gerontol.* 2021, *149*, 111317.
95. Hoffmann, J.; Mas-Peiro, S.; Berkowitsch, A.; Boeckling, F.; Rasper, T.; Pieszko, K.; De Rosa, R.; Hiczkiewicz, J.; Burchardt, P.; Fichtlscherer, S.; et al. Inflammatory signatures are associated with increased mortality after transfemoral transcatheter aortic valve implantation. *ESC Heart Fail.* 2020, *7*, 2597–2610.
96. Baratchi, S.; Zaldivia, M.T.K.; Wallert, M.; Loseff-Silver, J.; Al-Aryahi, S.; Zamani, J.; Thurgood, P.; Salim, A.; Htun, N.M.; Stub, D.; et al. Transcatheter Aortic Valve Implantation Represents an Anti-Inflammatory Therapy via Reduction of Shear Stress–Induced, Piezo-1–Mediated Monocyte Activation. *Circulation* 2020, *142*, 1092–1105.
97. Amancherla, K.; Wells, J.A.; Bick, A.G. Clonal hematopoiesis and vascular disease. *Semin. Immunopathol.* 2022, *44*, 303–308.
98. Heimlich, J.B.; Bick, A.G. Somatic Mutations in Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* 2022, *130*, 149–161.

99. Jaiswal, S.; Natarajan, P.; Silver, A.J.; Gibson, C.J.; Bick, A.G.; Shvartz, E.; McConkey, M.; Gupta, N.; Gabriel, S.; Ardissino, D.; et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 2017, *377*, 111–121.
100. Cobo, I.; Tanaka, T.; Glass, C.K.; Yeang, C. Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: Role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr. Opin. Hematol.* 2022, *29*, 1–7.
101. Fuster, J.J.; MacLauchlan, S.; Zuriaga, M.A.; Polackal, M.N.; Ostriker, A.C.; Chakraborty, R.; Wu, C.-L.; Sano, S.; Muralidharan, S.; Rius, C.; et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science* 2017, *355*, 842–847.
102. Buscarlet, M.; Provost, S.; Zada, Y.F.; Bourgoin, V.; Mollica, L.; Dubé, M.-P.; Busque, L. Lineage restriction analyses in CHIP indicate myeloid bias for TET2 and multipotent stem cell origin for DNMT3A. *Blood* 2018, *132*, 277–280.
103. Sano, S.; Oshima, K.; Wang, Y.; MacLauchlan, S.; Katanasaka, Y.; Sano, M.; Zuriaga, M.A.; Yoshiyama, M.; Goukassian, D.; Cooper, M.A.; et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018, *71*, 875–886.
104. Mas-Peiro, S.; Hoffmann, J.; Fichtlscherer, S.; Dorsheimer, L.; Rieger, M.A.; Dimmeler, S.; Vasa-Nicotera, M.; Zeiher, A.M. Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur. Heart J.* 2020, *41*, 933–939.
105. Mukherjee, R.; Kanti Barman, P.; Kumar Thatoi, P.; Tripathy, R.; Kumar Das, B.; Ravindran, B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci. Rep.* 2015, *5*, 13886.
106. Abplanalp, W.T.; Mas-Peiro, S.; Cremer, S.; John, D.; Dimmeler, S.; Zeiher, A.M. Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential with Inflammatory Gene Expression in Patients with Severe Degenerative Aortic Valve Stenosis or Chronic Postischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol.* 2020, *5*, 1170–1175.
107. Gluba-Brzózka, A.; Franczyk, B.; Rysz-Górzyńska, M.; Ławiński, J.; Rysz, J. Emerging Anti-Atherosclerotic Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, *22*, 12109.

108. Hafiane, A.; Daskalopoulou, S.S. Targeting the residual cardiovascular risk by specific anti-inflammatory interventions as a therapeutic strategy in atherosclerosis. *Pharmacol. Res.* 2022, *178*, 106157.
109. Libby, P. Interleukin-1 Beta as a Target for Atherosclerosis Therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2017, *70*, 2278–2289.
110. Ridker, P.M.; Everett, B.M.; Thuren, T.; MacFadyen, J.G.; Chang, W.H.; Ballantyne, C.; Fonseca, F.; Nicolau, J.; Koenig, W.; Anker, S.D.; et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N. Engl. J. Med.* 2017, *377*, 1119–1131.
111. Winter, C.; Soehnlein, O. The potential of chronopharmacology for treatment of atherosclerosis: *Curr. Opin. Lipidol.* 2018, *29*, 368–374.
112. Gao, L.; Zeng, H.; Zhang, T.; Mao, C.; Wang, Y.; Han, Z.; Chen, K.; Zhang, J.; Fan, Y.; Gu, J.; et al. MicroRNA-21 deficiency attenuated atherogenesis and decreased macrophage infiltration by targeting Dusp-8. *Atherosclerosis* 2019, *291*, 78–86.
113. Behl, T.; Bungau, S.; Kumar, K.; Zengin, G.; Khan, F.; Kumar, A.; Kaur, R.; Venkatachalam, T.; Tit, D.M.; Vesa, C.M.; et al. Pleotropic Effects of Polyphenols in Cardiovascular System. *Biomed. Pharmacother.* 2020, *130*, 110714.
114. Naruszewicz, M.; Łaniewska, I.; Millo, B.; Dłużniewski, M. Combination therapy of statin with flavonoids rich extract from chokeberry fruits enhanced reduction in cardiovascular risk markers in patients after myocardial infraction (MI). *Atherosclerosis* 2007, *194*, e179–e184.
115. Sabir, F.; Barani, M.; Mukhtar, M.; Rahdar, A.; Cucchiari, M.; Zafar, M.N.; Behl, T.; Bungau, S. Nanodiagnosis and Nanotreatment of Cardiovascular Diseases: An Overview. *Chemosensors* 2021, *9*, 67.
116. Nakashiro, S.; Matoba, T.; Umezu, R.; Koga, J.; Tokutome, M.; Katsuki, S.; Nakano, K.; Sunagawa, K.; Egashira, K. Pioglitazone-Incorporated Nanoparticles Prevent Plaque Destabilization and Rupture by Regulating Monocyte/Macrophage Differentiation in *ApoE^{-/-}* Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2016, *36*, 491–500.
117. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. *N. Engl. J. Med.* 1998, *339*, 1349–1357.

118. Gheorghe, G.; Toth, P.P.; Bungau, S.; Behl, T.; Ilie, M.; Pantea Stoian, A.; Bratu, O.G.; Bacalbasa, N.; Rus, M.; Diaconu, C.C. Cardiovascular Risk and Statin Therapy Considerations in Women. *Diagnostics* 2020, *10*, 483.
119. Rossebø, A.B.; Pedersen, T.R.; Boman, K.; Brudi, P.; Chambers, J.B.; Egstrup, K.; Gerds, E.; Gohlke-Bärwolf, C.; Holme, I.; Kesäniemi, Y.A.; et al. Intensive Lipid Lowering with Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis. *N. Engl. J. Med.* 2008, *359*, 1343–1356.
120. Arefieva, T.I.; Filatova, A.Y.; Potekhina, A.V.; Shchinova, A.M. Immunotropic Effects and Proposed Mechanism of Action for 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A Reductase Inhibitors (Statins). *Biochem. Biokhimiia* 2018, *83*, 874–889.
121. Peri-Okonny, P.A.; Liu, Y.; Malaisrie, S.C.; Huded, C.P.; Kapadia, S.; Thourani, V.H.; Kodali, S.K.; Webb, J.; McAndrew, T.C.; Leon, M.B.; et al. Association of Statin Use and Mortality after Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J. Am. Heart Assoc.* 2019, *8*, e011529.
122. Huded, C.P.; Benck, L.R.; Stone, N.J.; Sweis, R.N.; Ricciardi, M.J.; Malaisrie, S.C.; Davidson, C.J.; Flaherty, J.D. Relation of Intensity of Statin Therapy and Outcomes after Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Am. J. Cardiol.* 2017, *119*, 1832–1838.
123. Sasaki, K.; Watanabe, Y.; Kozuma, K.; Kataoka, A.; Hioki, H.; Nagura, F.; Fumiaki, Y.; Shirai, S.; Tada, N.; Yamawaki, M.; et al. Comparison of long-term mortality in patients who underwent transcatheter aortic valve replacement with or without anti-atherosclerotic therapy. *Heart Vessels* 2021, *36*, 1892–1902.
124. Khan, S.; Dargham, S.; Al Suwaidi, J.; Jneid, H.; Abi Khalil, C. Trends and Outcomes of Aortic Valve Replacement in Patients with Diabetes in the US. *Front. Cardiovasc. Med.* 2022, *9*, 844068.
125. Matsumoto, S.; Ohno, Y.; Miyamoto, J.; Ikari, Y.; Tada, N.; Naganuma, T.; Yamawaki, M.; Yamanaka, F.; Shirai, S.; Mizutani, K.; et al. Impact of diabetes mellitus on outcome after transcatheter aortic valve replacement: Identifying high-risk diabetic population from the OCEAN-TAVI registry. *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 2021, *98*, E1058–E1065.

Table 1. Main characteristics of human circulating monocyte subsets. Abbreviations: cluster differentiation (CD), interleukin (IL), tumor necrosis factor (TNF).

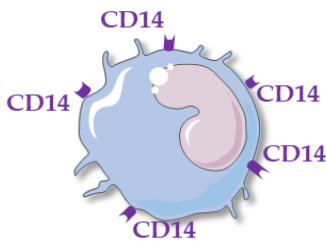
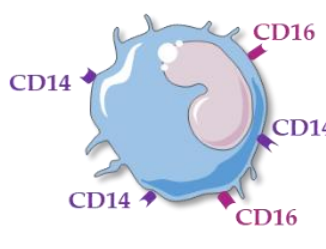
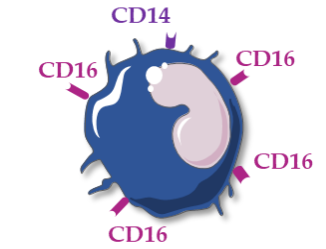
Monocyte Subsets	Classical Monocytes	Intermediate Monocytes	Non-Classical Monocytes
Schematic representation			
Surface receptors	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CD14 ⁺ CD16 ⁺⁺
Proportion of total monocytes	85–90%	5–10%	5–10%
Main functions	Phagocytosis, tissue repair, inflammation, reactive oxygen species production	Antigen presentation, T-cell proliferation and stimulation, reactive oxygen species production, phagocytosis	Patrolling of endothelial cell integrity, clearance of dying endothelial cells, wound healing
Cytokine production	IL-10, IL-6	TNF α , IL-1 β , IL-6	TNF α , IL-1 β , IL-6

Table 2. Evolution of the circulating monocyte subsets (absolute values, compared to pre-transcatheter aortic valve replacement (TAVR)) in patients with aortic valve stenosis underwent TAVR. Age, Society of Thoracic Surgeons (STS) score and European system for cardiac operative risk evaluation (EuroSCORE II) are presented as mean \pm standard deviation or median (interquartile ranges) according to available data. *: post-TAVR; =: stable; ↗: increase; ↘: decrease. Abbreviation: New York Heart Association (NYHA).

Number; Origin of Patients	Age; Gender Proportion	STS Score (%) EuroSCORE II (%)	Time of Blood Sampling	Classical Monocytes	Intermediate Monocytes	Non-Classical Monocytes	Association with Outcomes	Reference
44; Germany, single center	80.2 \pm 6.1; 50% male	2.5 (1.4–3.9); 3.6 (2.3–5.7)	Pre-TAVR	=	↘	=	Not available	Hewing [91]
			3 months *					
57; Germany, single center	83.3 \pm 0.79; 47% male	5.97 \pm 0.39; 6.71 \pm 0.65	Pre-TAVR	=	↘	=	High levels of intermediate monocytes pre-procedure associated with worse cardiac function and lower probability to reach an improvement in NYHA 3 months after TAVR	Neuser [92]
			Day 4 to 7 *					
120; Germany, single center	81; 33% male	>4	Pre-TAVR	No comparison between times			High levels of intermediate monocytes pre-procedure associated with 3-month mortality	Pfluecke [93] Cybularz [94]
			24 h *					
129; Germany, single center	83 (79–86); 76% male	3.41 (2.45–4.94) 3.31 (2.31–6.04)	Pre-TAVR	↗	↗	↗	High levels of intermediate monocytes pre-procedure trended to be predictive of 12-month mortality and high levels of non-classical monocytes post-procedure associated with 12-month mortality	Hoffmann [95]
			24 h *					

Annexe 3

Overwhelming negative impact of *TET2* mutations on long-term mortality after transcatheter aortic valve replacement

Fanny Lassalle^a, Nicolas Duployez^b, Flavien Vincent^a, Antoine Rauch^a, Tom Denimal^a, Mickael Rosa^a, Bart Staels^a, Claude Preudhomme^b, Sophie Susen^a, Eric Van Belle^a, and Annabelle Dupont^a

^aUniv. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1011- EGID, F-59000 Lille, France

^bUMR 9020–UMR-S 1277–Canther–Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, Institut de Recherche contre le Cancer de Lille, University Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, F-59000 Lille, France

Disclosure statement: Nothing to disclose

Funding statement: B. Staels is supported by grants from the Fondation Leducq convention 6CVD01 “Defining and targeting epigenetic pathways in monocytes and macrophages that contribute to cardiovascular disease”, the European Genomic Institute for diabetes (EGID, ANR-10-LABX-0046) and is a recipient of an Advanced ERC Grant (694717).

Address for correspondence: Annabelle Dupont, UMR Inserm 1011, Boulevard du Pr Jules Leclercq, 59037 Lille Cedex, France.

Email: annabelle.dupont@univ-lille.fr; Phone number: +33320444783; Fax number: +33320446989

Running title: *TET2* negatively impacts long-term survival after TAVR

Structured abstract

Background: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is considered as a novel age-related risk factor for cardiovascular diseases. Aortic valve stenosis (AVS) is an elderly pathology mediated by inflammation. *DNMT3A* and *TET2*-CHIP-driver variants have been identified in patients with AVS but not the full profile of CHIP-driver genes.

Objectives: We aimed to establish the full spectrum of CHIP in AVS patients undergoing transcatheter aortic valve replacement (TAVR) and to assess their association with long-term survival after TAVR.

Methods: Capture sequencing of a 67-gene panel was performed in 258 patients with severe AVS undergoing TAVR. Whole blood cell count, C-reactive protein, Von Willebrand factor and proinflammatory cytokines were measured before TAVR. The study was approved by ethic committee and complies with the Declaration of Helsinki.

Results: We identified 409 variants in 35 genes with a variant allele frequency $\geq 1\%$ in 191 of 258 patients (74%). *DNMT3A* and *TET2* were the most frequently mutated genes in the cohort and the prevalence of CHIP increased with age. Other recurrently affected genes were *PPM1D*, *ASXL1*, *TP53*, *SF3B1*, *CBL*, *SRSF2*, *NFE2* and *JAK2*. However, patients carrying a *TET2*-CHIP-driver variant had a significant inferior overall survival 5 years after TAVR (HR: 0.46 [95%CI: 0.25–0.87], $p=0.0020$), which also was evident in multivariate analysis ($p=0.027$).

Conclusion: This is the first study to describe the full profile of CHIP-driver genes in AVS and to demonstrate a striking prevalence of CHIP in this pathology. *TET2*-CHIP-driver mutations have an overwhelming negative impact on long-term survival after TAVR.

Key words: aortic valve stenosis; transcatheter aortic valve replacement, clonal haematopoiesis, survival

Condensed abstract

Clonal haematopoiesis of indeterminate potential (CHIP) is considered as a novel age-related risk factor for cardiovascular diseases. By capture-sequencing of a 67-gene panel, we established the full spectrum of CHIP in 258 patients with aortic valve stenosis (AVS) undergoing transcatheter aortic valve replacement (TAVR) and assessed their association with long-term mortality after TAVR. One or several CHIP-variants in 35 genes were identified in 74% of the cohort, *DNMT3A* and *TET2* being the 2 most frequently mutated genes. Patients carrying a *TET2*-CHIP-driver variant had a significant decrease of overall survival 5 years after TAVR.

Abbreviations list: AVS=aortic valve stenosis; CHIP=clonal haematopoiesis of indeterminate potential; CRP=C-reactive protein; TAVR=transcatheter aortic valve replacement; VAF=variant allele frequency, VWF:Ag=Von Willebrand factor antigen, VWF:CB= Von willebrand factor collagen binding

Introduction

Aortic valve stenosis (AVS) is the most prevalent valve disease in the elderly with an estimated prevalence from 2 to 7% in the population aged 65 years and over worldwide and a significant morbidity and mortality when left untreated[20]. The valve calcification leading to AVS is an active inflammatory process developing through an initial endothelial injury induced by *high shear stress and* close to atherosclerosis[179]. Since a couple of years, transcatheter aortic valve replacement (TAVR) has become the recommended technique for patients with severe AVS at high surgical risk as an alternative for surgery valve replacement, and its indications are even being extended to patients at moderate and low surgical risk[8,9,48]. However, despite a clear improvement of the patient's prognosis and quality of life, our team and others reported that TAVR remains associated with significant bleeding or thrombotic post-procedural complications like strokes or gastrointestinal bleedings[35,57,67,192], that could be associated with the systemic inflammation that occurs in more than 50% of patients within 48 hours after TAVR. Some teams tried to predict these TAVR complications by studying circulating biomarkers related to inflammation like C-reactive protein[76,79,95], N-terminal prohormone of B-type natriuretic peptide (NT-proBNP)[91], platelet- or neutrophil-to-lymphocyte ratio[81,83] or von Willebrand factor (VWF)[67] but even if the results are suggesting that these circulating markers can help to predict TAVR complications, they need to be tested in larger randomized populations. Clonal haematopoiesis of indeterminate potential (CHIP), defined as the presence of an expanded somatic blood-cell clone in persons without other hematologic abnormalities, has recently been described as a novel age-related risk factor for cardiovascular diseases[17,151]. The most frequently involved genes are *DNMT3A* and *TET2*, which both have a role in the regulation of DNA methylation but also in

proinflammatory pathways in monocytes and macrophages[18,158]. *TET2* has been specifically studied in animal models of cardiovascular diseases and it has been showed that its loss-of-function leads to accelerated atherosclerosis development in atherosclerosis-prone mice[151,163] and also to a greater cardiac dysfunction in murine models of heart failure[164], by altering inflammatory responses. Recently, Mas-Peiro et al. studied the incidence of CHIP-driver variants in *DNMT3A* and *TET2* in a cohort of 279 patients with severe AVS undergoing TAVR[167] and they reported that 33.3% of patients presented a CHIP-driver variant in *DNMT3A* and *TET2* and that the presence of these variants was associated with a decreased overall survival during a median 8-months follow-up period after TAVR. However, this study was limited to the 2 most common CHIP genes and did not deliver the full profile of CHIP-driver genes in an AVS cohort and their clinical association. Moreover, the effect of *TET2* was not separated from *DNMT3A*. In our study, we aimed to describe the full spectrum of CHIP-driver genes in a cohort of patients with severe AVS undergoing TAVR and to associate its presence with long-term mortality after TAVR. We also aimed to assess the potential prognostic significance of CHIP-driver variants with a variant allele frequency (VAF) under the threshold of 10%, which is considered as low VAF, and to distinguish the impact of *TET2* from other CHIP-driver genes on prognosis.

Methods

Patients

A retrospective cohort of 266 patients with severe AVS undergoing TAVR at the Lille University Hospital (CHU Lille) between 2011 and 2020 was studied. Patients were included from 3 different protocols registered as clinical trials (unique identifiers: NCT02628509,

NCT02972008 and NCT03728049). All patients provided written informed consent. Clinical and biological data were prospectively collected at the time of admission for TAVR. The molecular analysis was performed retrospectively in October 2021 on a sample before TAVR procedure. Eight patients were finally excluded because they had a history of hematologic disease. The study was approved by ethic committee and complies with the Declaration of Helsinki.

Molecular analysis

Genomic DNA was extracted using standard procedures and studied by captured-based high-throughput sequencing (HTS). Libraries were prepared according the Twist® NGS target enrichment solution (Twist BioScience) following the manufacturer's instructions with a 67-gene panel (Supplementary table I) and subsequently run on NovaSeq® (Illumina). Raw sequencing data were analyzed with MuTect2 and Vardict for variant calling and the inhouse NGSreport Software (CHU Lille) for data visualization, elimination of sequencing/mapping errors and retention of variants with high quality metrics. A depth of coverage of at least 1500x was obtained for all genes. Variants were retained for final interpretation if they were carried by at least 25 reads. Identified variants were named according to the rules of the Human Genome Variation Society. Variant interpretation was performed considering minor allele frequencies in the public GnomAD database of polymorphisms (variants with minor allele frequency > 0.02 in overall population/global ancestry or sub-continental ancestry were excluded), variant allele frequencies, prevalence and clinical interpretation in our in-house database. Frameshift and nonsense variants were always considered as relevant variants and additional *in silico* predictions were performed when possible on missense and splicing variants.

Laboratory measurements

Blood samples were obtained the day before TAVR and between 24 and 72 hours after TAVR, and were analysed for a complete blood count and C-reactive protein (CRP) by standard methods as part of patient care at the Biology and Pathology Center (CHU Lille, France). Von Willebrand factor antigen (VWF:Ag) was measured using an immunoturbidimetric assay (LIAPHEN VWF:Ag, HYPHEN BioMed, Andresy, France) on a CS 2400 analyzer (Sysmex, Kobe, Japan) and Von Willebrand factor collagen binding (VWF:CB) using a an enzyme-linked immunosorbent assay, as previously described[193] with the use of equine type 1 collagen (Horm, Takeda Pharmaceutical, Paris, France). Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 and tumor necrosis factor (TNF) α concentrations were assessed using the ELLA Automated Immunoassay System (ProteinSimple, San Jose, CA, USA).

Statistical analyses

Continuous variables were expressed as medians (interquartile range (IQR)) and categorical variables as frequencies (percentage). Gaussian distribution was tested through the Shapiro-Wilk normality test. The Mann–Whitney U test or t-test (continuous variables) and chi-square test or Fisher's exact test (categorical variables) were used for comparisons between groups. The Kaplan-Meier analysis was used for survival analysis within the individuals groups. Log-rank (Mantel-Cox) testing was applied for comparison of event-free survival analysis. In addition, a multivariable Cox regression was performed to account for the potential effect of confounding variables. A two-sided p-value <0.05 was considered to be statistically significant. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software version 9.3 (San Diego, CA, USA) and SPSS version 24.0 (Chicago, IL, USA).

Results

High frequency of CHIP in patients with AVS

The initial cohort included 111 males and 155 females. Eight patients (4 males and 4 females) were then excluded because they had a history of hematologic disease. Finally, the study cohort was composed of 107 males and 151 females with a median age of 84 years (79 – 87). Their characteristics are presented in table 1. One hundred ninety one patients (74% of the whole cohort) present at least 1 CHIP driver mutation with a VAF $\geq 1\%$, which was the sensitivity reached with the technique (they will be called CHIP-positive). No variant was identified in only 67 patients (CHIP-negative, 26% of total cohort). The median age of CHIP-positive patients was significantly higher than CHIP-negative patients ($p=0.036$). There was no difference in the prevalence of CHIP between men and women. There were no significant differences in any clinical and biological parameters between CHIP-positive and CHIP-negative patients. As it was previously described in the general population[146], the prevalence of CHIP increased with age in our AVS cohort, with a prevalence of 50%, 71%, 78% and 79% of patients in the age groups of ≤ 69 years, 70 – 79 years, 80 – 89 years and ≥ 90 years respectively (Figure 1A).

High diversity of CHIP driver mutations in patients with AVS

A total of 409 variants in 35 genes were found in 191 patients. The full spectrum of CHIP variants is described in Figure 1B and 1C. The most common genes affected were *DNMT3A* and *TET2*, concerning 31% and 28% of the total variants identified, respectively. Ninety-five patients carried a variant in *DNMT3A* and 80 patients in *TET2*, including 25 with both genes affected. Other recurrently affected genes were *PPM1D* ($n=23$ patients, 7% of total variants),

ASXL1 (n=23, 7%), *TP53* (n=16, 4%), *SF3B1* (n=15, 4%), *CBL* (n=9, 3%), *SRSF2* (n=9, 2%) and *NFE2* (n=7, 2%). The variant V617F in *JAK2* was identified in 5 patients. The median number of variants detected in each patient among CHIP-positive was 2 (IQR: 1 – 3). The median VAF was 3% (IQR: 1 – 7) (Figure 2). Eighty-four patients (45%) carried only 1 CHIP-driver variant and 107 carried 2 to 10 variants. Sixteen patients had very large VAF (>30%) but they were not known for haematological disease. In patients with CHIP, the number of CHIP-driver variants and the median VAF did not significantly vary with patients' age. Among the 409 variants identified, 272 were single nucleotide substitutions, mainly transitions (62%) over transversions (38%), especially the transition C to T that has been previously described as a mutational signature characteristic of aging also being predominant in clonal haematopoiesis (Supplementary figure 1)[147,156,157,181].

Worse prognosis for patients carrying a TET2-CHIP driver variant

During the 5-years follow-up after TAVR, 95 patients died (37%), including 71 CHIP-positive and 24 CHIP-negative patients. The death rate of AVS patients during the 5-years follow-up after TAVR, depending on CHIP-driver genes is presented as a bubble chart in figure 3. We excluded the genes for which there was less than 3 patients mutated as death rate would not be really interpretable. For further analyses, we decided to study the specific effects of *DNMT3A* and *TET2* separately. Hence, we excluded the patients who had a variant in both genes (n=25). We also excluded patients with large VAF (>10%, n=53) in order to focus on the effect of low VAF, leading to a total of 185 patients for survival analysis (39% male), including 74 who died (Table II). There were no significant differences in any clinical parameters between *TET2*-positive patients and *TET2*-negative patients. Median time of follow-up was 4.0 years (2.7 – 5.0).

We separated the CHIP-positive patients in different subgroups depending on their mutated genes: *DNMT3A* alone or in association (n=55), *TET2* alone or in association (n=35), other CHIP-driver gene (n=28) and CHIP-negative (n=67). Kaplan-Meier survival analysis (Figure 4A) showed that patients carrying a *TET2*-CHIP-driver variant, alone or associated with a variant in another CHIP-driver gene (excepted *DNMT3A*), had a significant decreased overall survival 5 years after TAVR in comparison with patients carrying CHIP-driver variants in *DNMT3A* (HR: 0.40 [95% confidence interval (CI): 0.20-0.78], p=0.0030), in other CHIP-driver genes (HR: 0.46 [95% CI: 0.23-0.92], p=0.027), and with CHIP-negative patients (HR: 0.52 [95% CI: 0.58-0.97], p=0.024). When we compared the overall survival between *TET2*-positive patients (n=35) and all *TET2*-negative patients (including *DNMT3A*, other CHIP-driver genes and CHIP-negative patients, n=150), we observed that patients carrying a *TET2*-CHIP-driver variant had a significantly lower survival than patients without *TET2*-CHIP-driver variant (Figure 4B, (HR: 0.46 [95% CI: 0.25-0.87], p=0.0020). *TET2*-positive patients did not have a higher VAF than *TET2*-negative patients nor were older. No sex-based differences were present. Moreover, there was no significant differences between *TET2*-positive and *TET2*-negative patients for inflammatory circulating parameters including leucocytes, neutrophils, monocytes, CRP, VWF:Ag (Table II) and IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α evaluated in representative subgroups of patients (Figure 5). Finally, carrying a *TET2* variant remained independently associated with decreased overall survival 5 years after TAVR (HR: 0.611 [95% CI: 0.395–0.945], table III) after multivariate cox regression analysis with age, gender, history of renal insufficiency, heart failure or atrial fibrillation.

Discussion

This is the first study to investigate the full spectrum of CHIP-driver variants in patients with AVS undergoing TAVR. We demonstrated that somatic variants driving clonal haematopoiesis are very frequent in patients with AVS, with a prevalence of 74% of CHIP-positive patients in our cohort of 258 patients. This striking rate is significantly higher compared to data from the general population in the literature[146,183]. We identified 409 variants in a total of 35 haematopoietic genes. In accordance with previous studies, *DNMT3A* and *TET2* were the 2 most frequently mutated genes in the cohort, and the prevalence of CHIP increased with age. We proved that other CHIP-driver genes like *PPM1D*, *ASXL1*, *TP53*, *SF3B1*, *CBL*, *SRSF2*, *NFE2* and *JAK2* were also frequently associated with severe AVS. Even if most studies use a VAF of 2% to define CHIP[167,184], on one hand, this threshold is arbitrary and still discussed due to the improvement of techniques sensitivities[185] and on the other hand, some new evidences that even CHIP-driver variants with very low VAF (0.05 – 2%) have a clinical significance[156]. In addition, in our study, the measured VAF for a variant with an expected VAF of 2% will be between 1.1% and 2.9%. Even if we just focus on *DNMT3A* and *TET2*, we found a higher percentage of CHIP-positive patients than Mas-Peiro et al., with 150 patients on 258 (58.6%) against 33.3% in their cohort. Finally, if we strictly restrict results to VAF \geq 2%, we still have 120 *DNMT3A*- and/or *TET2*-positive patients (46.5%).

While most of the studies pool patients harbouring a variant in *DNMT3A* and/or *TET2* to evaluate the prognosis, we aimed to distinguish their association with mortality one from the other and from the other 33 genes identified in our study. Indeed, these 2 genes and their loss-of-function variants have divergent effects on hematopoietic stem cells[180], DNA methylation and inflammatory pathways[18], so they should be considered separately. In

addition, *DNMT3A* is involved in multipotent lineage whereas *TET2* is predominantly restricted to myeloid lineages[18]. We observed by univariate analysis that patients carrying a *TET2*-CHIP-driver variant at low VAF ($\leq 10\%$) had a worse prognosis with significant decreased overall survival during long term follow-up after TAVR, which was also evident in multivariate analysis by adjusting for known risk factors for mortality after TAVR. This is not the first study showing a lower impact of *DNMT3A* comparing to *TET2* in cardiovascular diseases. In their meta-analysis of 5 cohorts including 56597 patients with incident heart failure, Yu et al. showed that *ASXL1*, *TET2*, and *JAK2* driver-variants were each associated with an increased risk of heart failure, whereas *DNMT3A* was not[186].

TET2 is a key enzyme that catalyzes the demethylation of methylcytosine in DNA. There are a number of studies that showed that *TET2* deficiency in murine models leads to an enhanced inflammation, particularly with the increased secretion of IL-1 β mediated by NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3) inflammasome and IL-6 in macrophages[164,187]. AVS results from an active inflammatory process whose the mechanisms are close to atherosclerosis. IL-1 β has a predominant role in valve calcification by promoting cell proliferation and expression of matrix metalloproteinases as it was shown by Kaden et al[188].

Our study emphasizes the fact that IL-1 β and the inflammasome could be novel therapeutic targets in AVS and for the improvement of survival after TAVR for patients who are carrying *TET2* somatic variants. The large clinical trial Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS) has proved the effectiveness of canakinumab, a monoclonal antibody that inhibits IL-1 β , in reducing the risk of cardiovascular events particularly in patients with elevated markers of inflammation[132]. Colchicine has also been proven to lead to a significantly lower risk of ischemic cardiovascular events in patients with

a previous myocardial infarction[189]. Finally, a very recent study has shown that blocking the NLRP3 inflammasome reduces aortic valve calcification and stenosis by preventing the shift of macrophages towards the M1 phenotype and downregulating IL-1 β and IL-6 expression[190].

With the use of fluorescence-activated cell sorting analysis, Mas-Peiro et al. observed in patients with AVS and *TET2* CHIP-driver mutation increased levels of circulating non-classical monocytes (CD14^{dim}CD16⁺⁺). As non-classical monocytes are known to secrete high levels of inflammatory cytokines[168], this data supports the notion that an inflammatory mechanism may be critical to poor outcomes in TAVR[191]. Results of this study are strengthened by another study of the same group which observed by using single-cell RNA sequencing higher expression of mediators of inflammation, IL-1 β , IL-6 receptor and NLRP3 inflammasome complex and CD163, a receptor involved in macrophage activation syndrome, in circulating monocytes from 8 patients with severe AVS and *DNMT3A* or *TET2* mutations compared to age-matched healthy control participants without *DNMT3A* and *TET2* mutations[155]. This study does not differentiate patients with *DNMT3A* mutations and patients with *TET2* mutations. However, in our study, we didn't find any differences in IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α circulating concentrations between *TET2*-positive and *TET2*-negative patients. Functional studies in relevant preclinical models are still needed to unravel the exact mechanisms by which CHIP-driver variants contribute to AVS and impact the clinical prognosis after TAVR, especially in *TET2*. Our findings need to be validated in larger studies of consecutive patients before being used for decision-making in the management of patients with severe AVS undergoing TAVR.

Conclusions

In conclusion, we showed in this study that AVS is associated with a high prevalence and a large spectrum of CHIP-driver variants, the most common being in *DNMT3A* and *TET2* but also in 33 other myeloid genes. These results are in line with previous studies describing CHIP as a novel age-related risk factor for cardiovascular diseases. Acquired variants in *TET2* are the most associated with long-term mortality after TAVR in comparison with other CHIP-driver genes, including *DNMT3A*. This finding could provide a novel tool for prognosis assessment in patients with severe AVS treated by TAVR.

Perspectives

What is known? CHIP is considered as a novel age-related risk factor for cardiovascular diseases but the full profile of CHIP-driver variants in AVS has never been described nor their potential clinical significance.

What is new? Patients carrying *TET2* mutations have a decreased overall survival at 5 years after TAVR. AVS is associated with a high prevalence and a large spectrum of CHIP-driver variants.

What is next? These findings contribute to the understanding of the pathogenesis of AVS and might help decision-making in the management of AVS patients undergoing TAVR.

References

1. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P, et al. Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primer*. 2016;2:16006.
2. Lassalle F, Rosa M, Staels B, Van Belle E, Susen S, Dupont A. Circulating Monocyte Subsets and Transcatheter Aortic Valve Replacement. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10):5303.
3. Popma JJ, Deeb GM, Yakubov SJ, et al. Transcatheter Aortic-Valve Replacement with a Self-Expanding Valve in Low-Risk Patients. *N Engl J Med*. 2019;380(18):1706-1715.
4. Otto CM, Nishimura RA, Bonow RO, et al. 2020 ACC/AHA Guideline for the Management of Patients With Valvular Heart Disease: Executive Summary. *J Am Coll Cardiol*. 2021;77(4):450-500.
5. Vahanian A, Beyersdorf F, Praz F, et al. 2021 ESC/EACTS Guidelines for the management of valvular heart disease. *Eur Heart J*. 2022;43(7):561-632.
6. Van Belle E, Hengstenberg C, Lefevre T, et al. Cerebral Embolism During Transcatheter Aortic Valve Replacement: The BRAVO-3 MRI Study. *J Am Coll Cardiol*. 2016;68(6):589-599.
7. Kapadia S, Agarwal S, Miller DC, et al. Insights Into Timing, Risk Factors, and Outcomes of Stroke and Transient Ischemic Attack After Transcatheter Aortic Valve Replacement in the PARTNER Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2016;9(9):e002981.
8. Van Belle E, Debry N, Vincent F, et al. Cerebral Microbleeds During Transcatheter Aortic Valve Replacement: A Prospective Magnetic Resonance Imaging Cohort. *Circulation*. 2022;146:383-397.
9. Van Belle E, Vincent F, Rauch A, et al. von Willebrand Factor and Management of Heart Valve Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2019;73(9):1078-1088.
10. Oury C, Nchimi A, Lancellotti P, Bergler-Klein J. Can Blood Biomarkers Help Predicting Outcome in Transcatheter Aortic Valve Implantation? *Front Cardiovasc Med*. 2018;5:31.
11. Lindman BR, Breyley JG, Schilling JD, et al. Prognostic utility of novel biomarkers of cardiovascular stress in patients with aortic stenosis undergoing valve replacement. *Heart Br Card Soc*. 2015;101(17):1382-1388.

12. Hioki H, Watanabe Y, Kozuma K, et al. Effect of Serum C-Reactive Protein Level on Admission to Predict Mortality After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am J Cardiol.* 2018;122(2):294-301.
13. Koskinas KC, O'Sullivan CJ, Heg D, et al. Effect of B-type Natriuretic Peptides on Long-Term Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am J Cardiol.* 2015;116(10):1560-1565.
14. Navani RV, Quine EJ, Duffy SJ, et al. Relation of Preprocedure Platelet-to-Lymphocyte Ratio and Major Adverse Cardiovascular Events Following Transcatheter Aortic Valve Implantation for Aortic Stenosis. *Am J Cardiol.* 2022;163:65-70.
15. Condado JF, Junpaparp P, Binongo JN, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio (NLR) and platelet-lymphocyte ratio (PLR) can risk stratify patients in transcatheter aortic-valve replacement (TAVR). *Int J Cardiol.* 2016;223:444-449.
16. Heimlich JB, Bick AG. Somatic Mutations in Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2022;130(1):149-161.
17. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *N Engl J Med.* 2017;377(2):111-121.
18. Cobo I, Tanaka T, Glass CK, Yeang C. Clonal hematopoiesis driven by DNMT3A and TET2 mutations: role in monocyte and macrophage biology and atherosclerotic cardiovascular disease. *Curr Opin Hematol.* 2022;29(1):1-7.
19. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, et al. Lineage restriction analyses in CHIP indicate myeloid bias for TET2 and multipotent stem cell origin for DNMT3A. *Blood.* 2018;132(3):277-280.
20. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2 deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science.* 2017;355(6327):842-847.
21. Sano S, Oshima K, Wang Y, et al. Tet2-Mediated Clonal Hematopoiesis Accelerates Heart Failure Through a Mechanism Involving the IL-1 β /NLRP3 Inflammasome. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71(8):875-886.

22. Mas-Peiro S, Hoffmann J, Fichtlscherer S, et al. Clonal haematopoiesis in patients with degenerative aortic valve stenosis undergoing transcatheter aortic valve implantation. *Eur Heart J*. 2020;41(8):933-939.
23. Favalaro EJ, Henniker A, Facey D, Hertzberg M. Discrimination of von Willebrands disease (VWD) subtypes: direct comparison of von Willebrand factor:collagen binding assay (VWF:CBA) with monoclonal antibody (MAB) based VWF-capture systems. *Thromb Haemost*. 2000;84(4):541-547.
24. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2488-2498.
25. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-421.
26. Arends CM, Galan-Sousa J, Hoyer K, et al. Hematopoietic lineage distribution and evolutionary dynamics of clonal hematopoiesis. *Leukemia*. 2018;32(9):1908-1919.
27. Kiefer KC, Cremer S, Pardali E, et al. Full spectrum of clonal haematopoiesis-driver mutations in chronic heart failure and their associations with mortality. *ESC Heart Fail*. 2021;8(3):1873-1884.
28. Buscarlet M, Provost S, Zada YF, et al. DNMT3A and TET2 dominate clonal hematopoiesis and demonstrate benign phenotypes and different genetic predispositions. *Blood*. 2017;130(6):753-762.
29. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med*. 2014;371(26):2477-2487.
30. Jaiswal S. Clonal hematopoiesis and nonhematologic disorders. *Blood*. 2020;136(14):1606-1614.
31. Acuna-Hidalgo R, Sengul H, Steehouwer M, et al. Ultra-sensitive Sequencing Identifies High Prevalence of Clonal Hematopoiesis-Associated Mutations throughout Adult Life. *Am J Hum Genet*. 2017;101(1):50-64.
32. Ostrander EL, Kramer AC, Mallaney C, et al. Divergent Effects of Dnmt3a and Tet2 Mutations on Hematopoietic Progenitor Cell Fitness. *Stem Cell Rep*. 2020;14(4):551-560.

33. Yu B, Roberts MB, Raffield LM, et al. Association of Clonal Hematopoiesis With Incident Heart Failure. *J Am Coll Cardiol*. 2021;78(1):42-52.
34. Cai Z, Kotzin JJ, Ramdas B, et al. Inhibition of Inflammatory Signaling in Tet2 Mutant Preleukemic Cells Mitigates Stress-Induced Abnormalities and Clonal Hematopoiesis. *Cell Stem Cell*. 2018;23(6):833-849.e5.
35. Kaden JJ, Dempfle CE, Grobholz R, et al. Interleukin-1 beta promotes matrix metalloproteinase expression and cell proliferation in calcific aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2003;170(2):205-211.
36. Ridker PM, Everett BM, Thuren T, et al. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*. 2017;377(12):1119-1131.
37. Tardif JC, Kouz S, Waters DD, et al. Efficacy and Safety of Low-Dose Colchicine after Myocardial Infarction. *N Engl J Med*. 2019;381(26):2497-2505.
38. Lu J, Xie S, Deng Y, Xie X, Liu Y. Blocking the NLRP3 inflammasome reduces osteogenic calcification and M1 macrophage polarization in a mouse model of calcified aortic valve stenosis. *Atherosclerosis*. 2022;347:28-38.
39. Mukherjee R, Kanti Barman P, Kumar Thatoi P, Tripathy R, Kumar Das B, Ravindran B. Non-Classical monocytes display inflammatory features: Validation in Sepsis and Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Rep*. 2015;5:13886.
40. Sridhar S, Pham DH, Gee TW, Hua J, Butcher JT. Monocytes and macrophages in heart valves: Uninvited guests or critical performers? *Curr Opin Biomed Eng*. 2018;5:82-89.
41. Abplanalp WT, Mas-Peiro S, Cremer S, John D, Dimmeler S, Zeiher AM. Association of Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential With Inflammatory Gene Expression in Patients With Severe Degenerative Aortic Valve Stenosis or Chronic Postischemic Heart Failure. *JAMA Cardiol*. 2020;5(10):1170-1175.

Figures legends

Figure 1: Full profile of CHIP in our patients studied by captured-based high-throughput sequencing. (A) Prevalence of CHIP according to age; B) Proportion of common CHIP-variants in individuals in which a variant was identified (191 CHIP-positive patients, 409 variants); (C) Molecular landscape showing co-variants in 191 CHIP-positive patients. Black boxes indicate several mutations within the same gene. Each column represents one patient. CHIP: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential

Figure 2: Litter plot of VAF for each CHIP-driver variant. The number of variant identified for each gene is: *DNMT3A*=125, *TET2*=113, *PPM1D*=27, *ASXL1*=27, Splicing=30, *TP53*=17, *CBL*=11, others=59. Splicing includes *SF3B1*, *SRSF2* and *U2AF1*. The median VAF is shown as horizontal line. Three values are not shown in this graph because of VAFs higher than 50% (1 *DNMT3A*, VAF 73% and 2 *TET2*: VAF 64% and 75%). CHIP: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential, VAF: variant allele frequency.

Figure 3: Incidence of deaths in CHIP-positive patients depending on the genes. The bubble size represents the number of patients mutated for the gene on the horizontal axis (also given in absolute number). Genes with less than 3 patients mutated in were excluded. CHIP: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential.

Figure 4: Kaplan-Meier survival analyses of AVS patients during a 5-years follow-up after TAVR (A) defined by different subgroups depending on the mutated genes; (B) depending on

TET2-CHIP-driver gene. Patients presenting a variant in both *DNMT3A* and *TET2* genes were excluded, as well as patients with a VAF >10%. AVS: aortic valve stenosis, TAVR: transcatheter aortic valve replacement, CHIP: Clonal haematopoiesis of indeterminate potential.

Figure 5: Circulating concentration of IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF α cytokines before TAVR in *TET2*-positive (n=8) and *TET2*-negative patients (n=24).

Central illustration: *TET2* mutations are significantly associated with an inferior overall survival 5 years after transcatheter aortic valve replacement in patients with severe aortic valve stenosis.

Table I: Clinical and biological characteristics in patients with and without CHIP¹-driver mutations. Continuous variables were expressed as medians (interquartile range) and categorical variables as frequencies (percentage).

Characteristics	All patients	CHIP-positive	CHIP-negative	p-value
Number of patients	258	191	67	
Sex (male)	107 (42%)	76 (40%)	31 (46)	0.389
Median age, years	84 (79 – 87)	84 (80 – 87)	82 (76 – 86)	0.036
• ≤ 69 years	13 (5)	7 (4)	6 (9)	0.198
• 70 – 79 years	57 (22)	39 (20)	18 (27)	
• 80 – 89 years	160 (62)	123 (64)	37 (55)	
• ≥ 90 years	28 (11)	22 (12)	6 (9)	
Medical history and CV² risk factors				
BMI ³ (kg/m ²)	27.2 (23.7 – 30.1)	27.1 (23.5 – 29.9)	27.6 (23.8 – 31.9)	0.451
Smoking	32 (12)	23 (12)	9 (13)	0.514
Diabetes	75 (29)	57 (30)	18 (27)	0.755
Arterial hypertension	192 (74)	140 (73)	52 (78)	0.520
Dyslipidemia	123 (48)	87 (46)	36 (54)	0.258
Atrial fibrillation	82 (32)	64 (33)	18 (27)	0.361
Renal insufficiency	113 (44)	85 (45)	28 (42)	0.775
Heart failure	43 (17)	35 (18)	8 (12)	0.258
Coronary artery disease	109 (42)	78 (41)	31 (46)	0.474
Previous myocardial infarction	22 (9)	19 (11)	3 (4)	0.210
Previous stroke	42 (17)	28 (16)	14 (21)	0.251
Logistic Euroscore	16.9 (12.1 – 25.1)	16.9 (12.2 – 25.8)	16.2 (10.6 – 23.5)	0.458
Euroscore II	3.75 (2.31 – 6.70)	3.95 (2.58 – 7.47)	3.29 (2.03 – 5.74)	0.100
STS Score	4.28 (3.11 – 6.07)	4.27 (3.16 – 6.01)	4.44 (3.08 – 7.24)	0.938
CHA2DS2-VASc score	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	0.940

^a clonal haematopoiesis of indeterminate potential

² cardiovascular

³ body mass index

Biological parameters at admission				
Leucocytes (G/L)	6.5 (5.2 – 8.0)	6.6 (5.2 – 8.0)	6.2 (5.4 – 7.9)	0.542
Neutrophils (G/L)	4.3 (3.4 – 5.5)	4.3 (3.4 – 5.4)	4.0 (3.3 – 5.7)	0.640
Lymphocytes (G/L)	1.3 (0.9 – 1.7)	1.3 (0.9 – 1.6)	1.3 (0.9 – 1.7)	0.936
Monocytes (G/L)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.6 (0.4 – 0.8)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.493
Platelets (G/L)	220 (170 – 268)	223 (176 – 269)	209 (169 – 255)	0.259
C-reactive protein (mg/L)	1 (1 – 7)	1 (1 – 6)	3 (1 – 8)	0.217
VWF:Ag (U/L)	174 (133 – 225)	171 (132 – 224)	180 (133 – 231)	0.774
Ratio VWF:CB/VWF:Ag	0.74 (0.63 – 0.85)	0.74 (0.61 – 0.83)	0.75 (0.65 – 0.86)	0.727

Table II: Clinical and biological characteristics of AVS⁴ patients depending on TET2 identification. For this table, patients presenting both *DNMT3A* and *TET2* variants were excluded from the “*TET2*-positive” column, as well as patients with a VAF⁵ >10% from the total cohort. “*TET2*-2 negative” includes patients with a CHIP⁶-driver variant identified in another gene than *TET2* and CHIP-negative patients. Continuous variables were expressed as medians (interquartile range) and categorical variables as frequencies (percentage).

Characteristics	All patients	<i>TET2</i> -positive	<i>TET2</i> -negative	p-value
Number of patients	185	35	150	
Sex (male)	72 (39%)	15 (43%)	57 (38%)	0.701
Median age (years)	84 (79 – 87)	85 (81 – 88)	84 (78 – 86)	0.152
• ≤ 69 years	12 (6)	1 (3)	11 (7)	0.443
• 70 – 79 years	40 (22)	5 (15)	35 (24)	
• 80 – 89 years	114 (62)	25 (71)	89 (59)	
• ≥ 90 years	19 (10)	4 (11)	15 (10)	
Medical history and CV⁷ risk factors				
BMI ⁸ (kg/m ²)	26.8 (23.3 – 30.3)	26.4 (21.5 – 32.8)	26.9 (23.5 – 30.1)	0.845
Smoking	20 (11)	4 (11)	16 (11)	>0.999
Diabetes	56 (30)	12 (34)	44 (29)	0.199
Arterial hypertension	138 (74)	23 (66)	115 (77)	0.226
Dyslipidemia	90 (48)	15 (43)	75 (50)	0.460
Atrial fibrillation	61 (33)	13 (37)	48 (32)	0.556
Renal insufficiency	75 (41)	14 (40)	61 (41)	>0.999
Heart failure	26 (14)	8 (23)	18 (12)	0.108
Coronary artery disease	77 (42)	17 (49)	60 (40)	0.447
Previous myocardial infarction	14 (8)	4 (11)	10 (7)	0.307
Previous stroke	32 (17)	4 (11)	28 (19)	0.456
Logistic Euroscore	16.9 (12.0 – 25.2)	17.3 (13.1 – 23.6)	16.8 (11.4 – 25.3)	0.567
Euroscore II	3.82 (2.10 – 6.70)	4.48 (3.04 – 9.45)	3.75 (2.04 – 3.67)	0.194
STS Score	4.05 (3.08 – 6.14)	4.05 (2.66 – 7.59)	4.04 (3.10 – 6.06)	0.731
CHA2DS2-VASc score	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	4 (4 – 5)	0.985

⁴ aortic valve stenosis

⁵ variant allele frequency

⁶ clonal haematopoiesis of indeterminate potential

⁷ cardiovascular

⁸ body mass index

Biological parameters at admission				
Leucocytes (G/L)	6.4 (5.3 – 7.9)	6.8 (5.0 – 8.7)	6.2 (5.3 – 7.8)	0.413
Neutrophils (G/L)	4.2 (3.3 – 5.4)	4.6 (3.4 – 5.9)	4.1 (3.3 – 5.2)	0.371
Lymphocytes (G/L)	1.3 (1.0 – 1.7)	1.4 (0.8 – 1.6)	1.3 (1.0 – 1.7)	0.997
Monocytes (G/L)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.6 (0.4 – 0.8)	0.5 (0.4 – 0.7)	0.929
Platelets (G/L)	221 (171 – 266)	230 (195 – 259)	219 (169 – 268)	0.564
C-reactive protein (mg/L)	1 (1 – 6)	1 (1 – 7)	1 (1 – 6)	0.860
VWF:Ag (U/L)	161 (128 – 201)	160 (127 – 231)	162 (129 – 192)	0.850
Ratio VWF:CB/VWF:Ag	0.73 (0.61 – 0.84)	0.73 (0.65 – 0.82)	0.74 (0.60 – 0.85)	0.881

Table III: Multivariate Cox regression analysis for mortality.

Variable	p-value	Hazard ratio	95% CI
<i>TET2</i> presence	0.027	0.611	0.395 – 0.945
Age	0.092	1.024	0.996 – 1.053
Gender	0.849	0.966	0.672 – 1.386
Renal insufficiency	0.621	0.908	0.619 – 1.332
Heart failure	0.997	1.001	0.587 – 1.706
Atrial fibrillation	0.458	1.146	0.799 – 1.644

Résumé

Impact de l'inflammation sur les complications post-procédurales du TAVI : rôle des monocytes et de l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée

Le remplacement de la valve aortique par voie percutanée (TAVI) ou chirurgicale classique représente aujourd'hui l'unique option thérapeutique pour le traitement de la sténose valvulaire aortique (SVA) sévère, valvulopathie la plus fréquente chez le sujet âgé associée à une morbi-mortalité importante en l'absence de prise en charge. Malgré une amélioration significative du pronostic du patient et de sa qualité de vie, le TAVI reste associé à des complications post-procédurales (hémorragies, thromboses, décès) dont les mécanismes sont encore méconnus. Quelques biomarqueurs, notamment d'inflammation, ont été proposés pour prédire le pronostic des patients après TAVI mais leurs performances restent limitées.

Acteurs essentiels des processus d'immunothrombose, les monocytes pourraient être impliqués dans les mécanismes de ces complications. Des études récentes ont établi des associations entre les 3 sous-populations monocytaires sanguines et les maladies cardiovasculaires avec une valeur pronostique de la répartition de ces différentes sous-populations monocytaires. L'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP) apparaît aussi comme un nouveau facteur de risque lié à l'âge des maladies cardiovasculaires.

La première partie de ce travail avait pour objectif d'étudier le profil inflammatoire et la modulation du phénotype des monocytes circulants lors de la procédure TAVI et leur association avec les complications post-procédurales (hémorragies, thromboses, décès). Ainsi, nous avons étudié l'évolution des concentrations circulantes des différentes sous-populations monocytaires et celle du transcriptome des monocytes avant (J0) et 24 heures après le TAVI (J1) dans une cohorte de patients avec SVA sévère suivie pendant 3 ans. Nous avons observé une augmentation des concentrations circulantes des monocytes classiques et intermédiaires à J1 par rapport à T0 et une association significative entre des concentrations élevées de monocytes intermédiaires à T0 et une survie globale diminuée 3 ans après le TAVI. Nous avons aussi montré que le TAVI a un impact sur le transcriptome des monocytes, avec la surexpression de gènes impliqués dans les fonctions monocytaires et macrophagiques après TAVI.

Dans une deuxième partie, nous avons mis en évidence dans une cohorte de 258 patients que la SVA était associée à un large profil mutationnel de CHIP et que les mutations dans le gène *TET2* étaient de mauvais pronostic, avec une survie globale significativement diminuée à 5 ans après TAVI.