

UNIVERSITE DE LILLE
ECOLE GRADUEE BIOLOGIE-SANTE

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Spécialité Sciences de la vie et de la santé

Département Biologie, médecine et santé

Conseil National des Universités 51 - Pathologie cardio-respiratoire et vasculaire

**MODULATION MEDICAMENTEUSE DES CALCIFICATIONS
VALVULAIRES DANS UN MODELE OVIN DE XENOGREFFE AORTIQUE**

Soutenue le 21 décembre 2023 à la Faculté de médecine de Lille, pôle Recherche, par

Jérôme SOQUET

JURY

Madame le Professeur Sophie SUSEN	Présidente
Monsieur le Professeur Pierre-Yves LITZLER	Rapporteur
Monsieur le Professeur Roland HENAINE	Rapporteur
Monsieur le Professeur David SMADJA	Examineur
Monsieur le Professeur Francis JUTHIER	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur Mickaël ROSA	Co-encadrant de thèse

Ne te contente pas de pratiquer ton art,
mais fraie-toi un chemin dans ses secrets, il le mérite bien.
Car seuls l'art et le savoir peuvent élever l'homme jusqu'au Divin.

L. van Beethoven, Teplice, 1812

Remerciements

Je souhaite adresser mes plus sincères remerciements :

Aux Professeurs **Bart Staels**, **Sophie Susen** et **Eric Van Belle** pour m'avoir donné la possibilité de réaliser ma thèse de doctorat d'université dans l'unité de recherche UMR 1011 – Equipe 2, avec une reconnaissance particulière envers le Professeur **Sophie Susen** pour sa relecture du manuscrit.

A mes 2 co-directeurs de thèse, les Professeurs **Francis Juthier** et **Mickaël Rosa**, sans lesquels ces travaux n'auraient pas vu le jour. Merci Francis pour m'avoir accordé ta confiance et ton soutien, pour la réalisation de cette thèse, dans notre activité clinique et dans la vie de tous les jours. Tu es un exemple pour toute une génération de chirurgiens. Merci Mickaël pour avoir pris la casquette d'aide opératoire, pour les discussions enrichissantes, les innombrables relectures et ta compréhension des contraintes rencontrées par les chirurgiens. Je suis certain que la suite de ta carrière sera encore plus brillante et cela serait mérité.

Aux Professeurs **Pierre-Yves Litzler** et **Roland Hénaine**, membres de mon comité de suivi individuel et rapporteurs de mon jury, pour leur disponibilité sans faille malgré les délais très courts et la pertinence de leurs remarques au cours de ces 5 années.

Au Professeur **David Smadja**, pour me faire l'honneur de participer à mon jury.

Au Professeur **Delphine Corseaux**, pour son aide avec le modèle animal et sa bienveillance.

A Monsieur **Alexandre Ung**, pour son génie et sa sympathie appliqués à la recherche et pour avoir endossé le rôle de perfusionniste.

Au Docteur **Frédéric Mouquet**, pour toutes les échocardiographies (sans résection de côte !).

A l'équipe de choc du DHURE dirigée par le Docteur **Thomas Hubert**, qui ont pris soin des animaux à chaque instant : **Michel Pottier**, **Arnold Dive**, **Martin Fourdrinier** et **Frank Stevendrart**, avec des remerciements appuyés à Monsieur **Arnold Dive** pour avoir mis au point une technique d'administration de la capsule qui ne soit trop douloureuse ni pour l'animal, ni pour l'homme.

Aux membres de l'unité de recherche qui auront apporté une contribution décisive à mes travaux : Madame **Christina Le Tanno**, Monsieur **Eric Bouleaux**, Madame **Morgane Lenne** et Madame **Eloïse Borowczak**. A l'UMR 1011 – Equipe 2 en général, depuis mon année de Master 2 (10 ans déjà !) jusqu'à ce jour et au-delà.

Aux équipes (au sens très élargi) de **chirurgie cardiaque adulte** et de **chirurgie cardiaque pédiatrique** du Centre Hospitalier Universitaire de Lille, en particulier au Professeur **André Vincentelli**, mon chef de service, au Docteur **Natacha Rousse** dont les expériences sur le modèle animal m'auront beaucoup servi, aux Docteurs **Marie Jungling** et **Gabriella Ricciardi** et Messieurs **Alexandre Delagnès**, **Dylan Dupont** et **Ahmed Hadhoum** pour leur aide sur les interventions.

Au Docteur **Delphine Deblauwe**, pour son amitié et pour avoir sauvé tant d'animaux par ses conseils précieux.

A tous les **cochons**, **agneaux** et **animaux** qui nous permettent *in fine* d'être de meilleurs êtres humains.

Je souhaite exprimer toute mon affection et mes remerciements :

A mes parents : à **ma mère, Audrey**, à qui je dois tant et à mon **père, François**, qui aurait certainement été fier de cette réalisation. Nous nous retrouverons à coup sûr un jour, ici ou ailleurs.

A **Albert**, un frère dont je suis tellement fier et à qui je souhaite de trouver son bonheur prochainement car il le mérite tant.

A la **famille Tain**, en particulier à **Christophe**, mon 2^e frère envers lequel je suis tellement reconnaissant, et sa famille chérie : **Honorine, Noah**, et **Lenny**.

A mes amis, **Thanh-Mai, Estelle, Sabine, Mehdi** etc.

A ma belle-famille adorée : **Janet, Richard, Catherine** (ma thèse comporte plus de références bibliographiques que la tienne !), **Philippa, Beau, Violet** et **Sidney**.

A **Stephanie**, mon Immortelle Bien-Aimée, qui a traversé la planète pour mon plus grand bonheur, qui nous a offert 2 enfants magnifiques et à qui je dois tant et à tous les niveaux. A ton tour de briller !

ewig dein
ewig mein
ewig uns

A mes 2 garçons, **Frederick** « Didit » et **Jamieson** « Mieson », que j'aime et aimerai toujours. Merci de faire partie de ma vie et d'être les personnes que vous êtes.

Table des matières

LISTE DES ABBREVIATIONS.....	7
RESUME.....	8
ABSTRACT.....	10
INTRODUCTION.....	12
Chapitre 1 – Sténose valvulaire aortique.....	12
A. Calcifications valvulaires aortiques et sténose valvulaire aortique.....	12
B. Traitement de la sténose valvulaire aortique.....	36
C. Problématique des bioprothèses valvulaires.....	42
Chapitre 2 – Modèles animaux de calcifications valvulaires.....	44
A. Modèles petits mammifères.....	44
B. Modèles grands mammifères.....	48
Chapitre 3 – Acide rétinoïque et calcifications valvulaires aortiques.....	49
A. Métabolisme et utilisation des rétinoïdes.....	49
B. Modulation de la voie de l'acide rétinoïque dans les calcifications valvulaires aortiques... 55	
Chapitre 4 – Objectifs.....	57
MATERIELS ET METHODES.....	59
Chapitre 1 – Modèle animal : implantation d'une valve aortique porcine chez l'agneau sous circulation extracorporelle.....	59
A. Rationnel et autorisation.....	59
B. Protocoles d'anesthésie, de chirurgie et de circulation extracorporelle.....	60
Chapitre 2 – Modulation pharmacologique des calcifications valvulaires <i>in vivo</i> : all-trans retinoic acid (ATRA) ou trétinoïne.....	64
Chapitre 3 – Méthodes d'évaluation.....	65
A. Echocardiographie transthoracique.....	65
B. Analyses macroscopiques et histologiques.....	66
C. Analyses protéiques : Western blot.....	67
D. Analyses génétiques : RT-qPCR.....	69
E. Analyses statistiques.....	70
RESULTATS.....	72
Chapitre 1 – Fragilité du modèle animal utilisé.....	72
A. Description de la cohorte.....	72
B. Mortalité.....	74
Chapitre 2 – Modifications apportées au modèle animal et leurs effets.....	76
A. Mesures invasives.....	76
B. Mesures médicales.....	77

C. Effets des modifications du protocole	79
Chapitre 3 – Effets de l’acide rétinoïque sur les calcifications valvulaires <i>in vivo</i>	80
A. Description du groupe Etude	80
B. Modulation des calcifications valvulaires dans le modèle animal	83
DISCUSSION.....	88
Etude(s) de la sténose valvulaire aortique.....	88
Etude(s) de la détérioration structurelle des bioprothèses (SVD).....	90
Critiques et rationnel du modèle animal utilisé	93
Causes des complications	93
Rationnel du modèle.....	94
Acide rétinoïque et calcifications valvulaires aortiques	97
Perspective(s).....	98
CONCLUSION.....	101
BIBLIOGRAPHIE	102
ANNEXES	145
Annexe 1 : Brevet international WO 2021/064072 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve	146
Annexe 2 : Brevet américain US 2022/0339322 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve	166
Annexe 3 : Protocole de rinçage et de conservation de la racine aortique porcine avant implantation chez l’agneau.....	178
Annexe 4 : Page du projet RETINAVS sur le site internet de l’Agence Nationale de la Recherche	179
Annexe 5 : Communication au congrès de l’European Society for Surgical Research (ESSR) : programme et présentation PowerPoint.....	183

LISTE DES ABBREVIATIONS

ALDH1A1 : aldéhyde déshydrogénase 1 A1

AR : acide rétinoïque

ATRA : all-trans retinoic acid (ou acide tout-trans rétinoïque ou trétinoïne)

BMP : bone morphogenetic protein

CEC : circulation extracorporelle

MEC : matrice extra-cellulaire

RAR : récepteur de l'acide rétinoïque

RUNX2 : runt-related transcription factor 2

RVA : remplacement valvulaire aortique (chirurgical)

ScA : sclérose aortique

SVA : sténose valvulaire aortique

SVD : structural valve deterioration

TAVI : transcatheter aortic valve implantation

TGF- β : transforming growth factor beta

VEC : valvular endothelial cells (cellules endothéliales de valve)

VG : ventricule gauche

VIC : valvular interstitial cells (cellules interstitielles de valve)

RESUME

La sténose valvulaire aortique (SVA) est la valvulopathie la plus fréquente et la plus létale dans la population âgée dans les pays à revenu élevé. La physiopathologie des calcifications valvulaires aortiques est complexe et multifactorielle, s'apparentant dans beaucoup d'aspects à l'athérosclérose et dans laquelle le rôle des cellules interstitielles de valves (VIC) est central. En l'absence de traitement médicamenteux efficace, le recours à un traitement invasif (remplacement valvulaire chirurgical ou cathétérisme interventionnel) en cas de SVA serrée et/ou symptomatique est inévitable, induisant une autre problématique représentée par la durabilité limitée des bioprothèses valvulaires implantées et qui sont toutes d'origine animale.

L'objectif des travaux présentés est de tester *in vivo* l'effet de la modulation des calcifications valvulaires aortiques par une molécule de la famille des rétinoïdes, la trétinoïne, en se fondant sur des résultats probants de la modulation de voie de l'acide rétinoïque sur les VIC saines et pathologiques *in vitro*.

Un modèle grand animal de remplacement valvulaire aortique a été utilisé : il s'agit d'implanter une valve aortique porcine fraîche sous circulation extracorporelle en position pulmonaire chez l'agneau (20 kg) et de suivre l'évolution des calcifications valvulaires de la xénogreffe valvulaire (dont la calcification est attendue en l'absence de traitement). Vingt-huit spécimens ont été opérés, comprenant un groupe Contrôle et un groupe Trétinoïne traité de manière bijournalière par voie orale pendant 4 mois.

Le début de l'expérience a été marqué par une mortalité animale immédiate ou précoce très élevée (7/14 soit 50%) liée à la fragilité du modèle. La première partie des travaux a été en

grande partie consacrée à optimiser le modèle animal par des modifications de la technique chirurgicale et de la circulation extracorporelle, permettant la survie de la totalité des 12 derniers sujets jusqu'au terme des 4 mois d'étude. Enfin, un effet inhibiteur modéré de la trétinoïne sur les calcifications valvulaires des xénogreffes a été mis en évidence aux niveaux échocardiographique, histologique et protéique.

En conclusion, le remplacement valvulaire sous circulation extracorporelle chez l'agneau de petit poids est réalisable mais très délicat. De plus, la modulation de la voie des rétinoïdes semble être une piste prometteuse pour le ralentissement de la dégénérescence des bioprothèses valvulaires.

Mots clés : valve aortique ; sténose valvulaire aortique ; modèle animal ; acide rétinoïque; calcification ; bioprothèse ; dégénérescence structurelle de valve.

ABSTRACT

Aortic stenosis (AS) is the most frequent and the most lethal valvular heart disease in the elderly in high-income countries. Calcification of the aortic valve is a complex and multifactorial process, having many similarities with atherosclerosis and in which the role of valvular interstitial cells (VIC) is central. Because no pharmacological treatment is available, an invasive procedure (surgical aortic valve replacement or catheter intervention) is necessary in cases of severe and/or symptomatic AS. Furthermore, the limited durability of implanted bioprosthetic valves (of animal origin) represents another burden.

The aim of this work is to test *in vivo* the effect of the modulation of aortic valve calcification by a molecule from the retinoid group, tretinoin, based on positive results of the modulation of the retinoic pathway on healthy and diseased VIC *in vitro*.

An animal model of aortic valve replacement was used, which consists of implanting a fresh porcine aortic valve under cardiopulmonary bypass in pulmonary position in the juvenile sheep (20 kg) and of following the evolution of valvular calcifications of the xenograft (in which calcification is expected without treatment). Twenty-eight specimens were operated on. Two groups were compared: a Control group and a Tretinoin group (twice-daily oral treatment during 4 months).

Early experience was marked by a very high rate of immediate or early death (7/14, 50%) explained by the frailty of the model. The first part of the study was dedicated to improve the animal model by modifications of the surgical technique and of the cardiopulmonary bypass run, which allowed for the survival of the last 12 consecutive specimens until the end of the 4-months experimentation. Lastly, a moderate inhibiting action of tretinoin on valvular

calcifications of the xenograft was shown in echocardiographic, histological and protein expression analyses.

In conclusion, valve replacement under cardiopulmonary bypass in small weight juvenile sheep is feasible but carries a high operative risk. In addition, modulation of retinoids pathway may be a promising answer to slow down deterioration of bioprosthetic valves.

Keywords : aortic valve ; aortic stenosis ; animal model ; retinoic acid ; calcification ; bioprosthetic valve ; structural valve deterioration.

INTRODUCTION

Chapitre 1 – Sténose valvulaire aortique

A. Calcifications valvulaires aortiques et sténose valvulaire aortique

1. Epidémiologie et impacts de la sténose valvulaire aortique

Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde selon les données de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) publiées en 2020 (1). Les causes dominantes de mortalité cardiovasculaire sont la cardiopathie ischémique, l'accident vasculaire cérébral et l'hypertension artérielle avec respectivement 8.9 millions, 6.2 millions et 1.1 million de décès annuels. Le rhumatisme articulaire aigu (touchant 33.4 millions d'individus dans le monde en 2015 (2)) reste la première cause de mortalité valvulaire à l'échelle mondiale mais est en régression (288.000 décès en 2019 vs 341.000 en 2000) grâce à l'amélioration des conditions socio-économiques et des systèmes de soins dans les pays à faible revenu.

En revanche, la sténose valvulaire aortique (SVA) calcifiée de l'adulte est la valvulopathie acquise la plus létale dans les pays à revenu élevé. Il a ainsi été estimé que cette pathologie concernait environ 12.6 millions d'individus dans le monde en 2017, causant plus de 102.000 décès annuellement (3). Une large enquête européenne plaçait la SVA en tête de liste des valvulopathies en terme de fréquence (33.9% des valvulopathies sur valve native) et d'interventions nécessaires (46.6% des interventions valvulaires) devant l'insuffisance mitrale en 2003 (4). La SVA calcifiée, dont le premier stade consiste en une sclérose aortique (ScA), atteint préférentiellement la population âgée : les prévalences de la ScA et de la SVA ont ainsi été estimées à 29% et 2% respectivement dans une communauté nord-américaine de plus de

65 ans (5), et les répercussions économiques de la SVA évaluées à 10.2 milliards de dollars US par an aux Etats-Unis (6). La tendance à moyen terme va vers l'aggravation de ce problème de santé publique en raison du vieillissement de la population et de l'augmentation de l'espérance de vie à l'échelle globale, avec une multiplication prévue de la prévalence de la SVA serrée par un facteur 2.4 d'ici 2040 et de plus de 3 d'ici 2060 (7), surpassant selon toute vraisemblance le rhumatisme articulaire aigu dont l'incidence est en baisse.

La problématique de la SVA réside non seulement dans sa forte prévalence, mais également dans la sévérité de son retentissement clinique. Dans une étude de 2150 patients atteints de SVA serrée n'ayant pas bénéficié d'un remplacement valvulaire aortique (RVA) à court terme, la survie moyenne était estimée à moins de 2 ans (1.8 ans) en l'absence de traitement chirurgical ou interventionnel, avec seulement 11.6% des patients ayant survécu au bout de 5 ans (8).

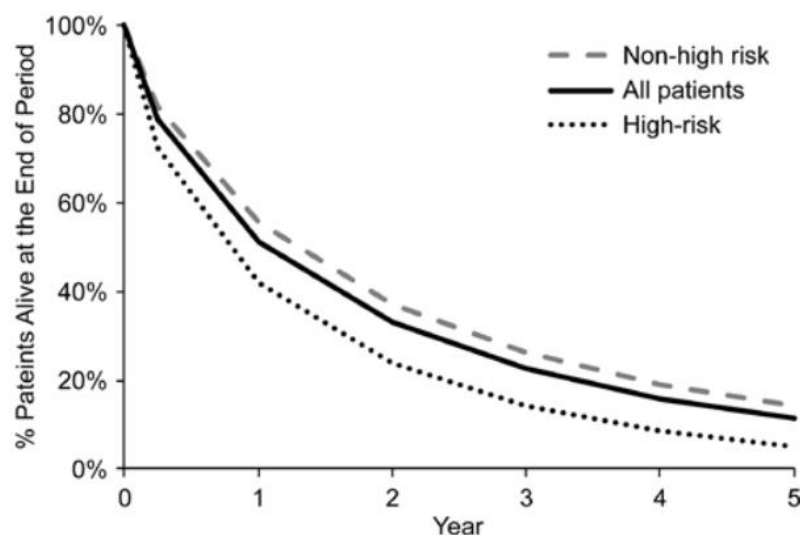


Figure 1. Survie à 5 ans des patients atteints de sténose valvulaire aortique serrée non traités chirurgicalement. D'après Clark et al. *Five-year clinical and economic outcomes among patients with medically managed severe aortic stenosis: results from a Medicare claims analysis.* *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 2012;5(5):697–704. Avec la permission de Wolters Kluwer Health, Inc. (8)

Un dernier élément caractérisant la SVA est l'absence de traitement pharmacologique disponible quel que soit le stade de la maladie, et la nécessité de recours à un traitement radical, qu'il soit chirurgical ou interventionnel, lorsque la SVA est sévère (9,10). Ce besoin de traitement invasif accentue ainsi davantage la pression sur les systèmes de santé, en particulier sur les centres hospitaliers dotés de services de chirurgie cardiaque, d'autant plus que la majorité des patients a plus de 70 ans et est souvent porteuse de comorbidités (4).

2. Embryologie et physiologie de la valve aortique

Le développement cardiaque est caractérisé par des interactions complexes cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire (MEC) (11) auxquelles le développement de la valve aortique n'est pas étranger. Le tube cardiaque primitif est constitué par une couche externe de cellules myocardiques et une couche interne de cellules endothéliales séparées par la gelée cardiaque. Pour les valves de la voie d'éjection (ou valves semi-lunaires, dont la valve aortique), une colonisation par des cellules de la crête neurale a en plus lieu au stade du *looping*, c'est-à-dire lorsque le tube cardiaque se plicature (**Figures 2 et 3**). Après le stade de *looping*, un groupe de **cellules endothéliales** situées dans le canal atrio-ventriculaire et la voie d'éjection sécrète une MEC riche en acide hyaluronique pour former les coussins endocardiques (*endocardial cushions*) : cette **transition endothélium-mésenchyme** (E9.5 – E10.5 du développement embryonnaire chez la souris) représente la première étape de la valvulogenèse.

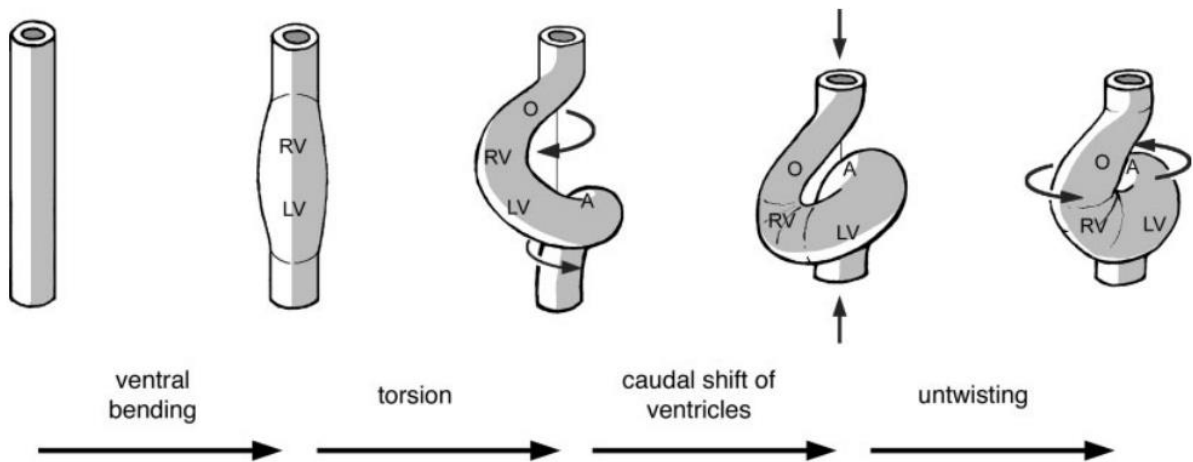


Figure 2. Séquences du *looping* cardiaque. D'après Männer. *The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations.* Clin Anat. 2009;22(1):21–35. Avec la permission de John Wiley and Sons. (12)

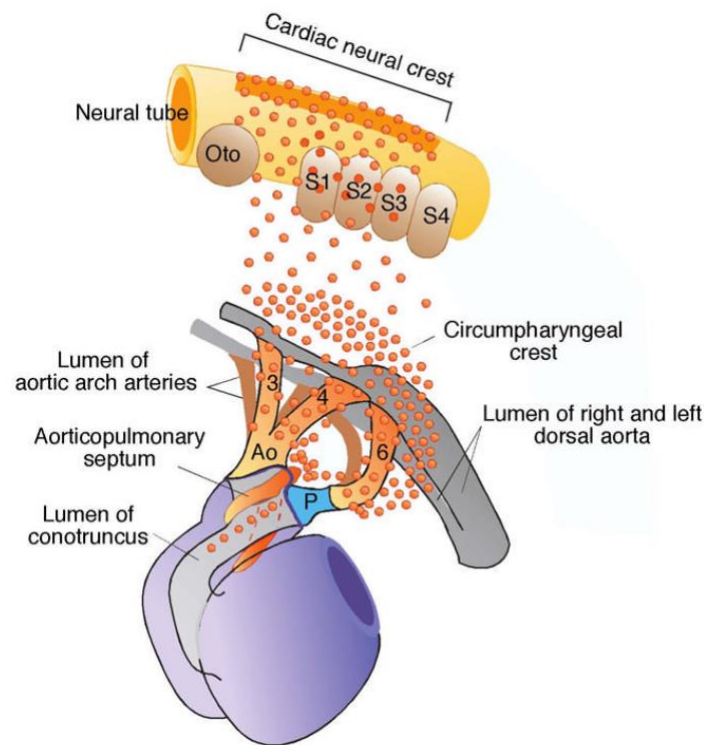


Figure 3. Migration des cellules de la crête neurale vers la voie d'éjection cardiaque. D'après Hutson et al. *Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations.* Semin Cell Dev Biol. 2007;18(1):101–10. Avec la permission d'Elsevier. (13)

Les coussins endocardiques, à l'origine des valves et des septa, achèvent leur développement avec les stades du remodelage (E10.5 – E.18.5), de l'élongation et de la maturation (E.14.5 à 1 semaine après la naissance). Le **remodelage** valvulaire peut lui-même être décomposé en différents stades qui se chevauchent : expansion mésenchymateuse (E10.5 – E.12.5), différenciation (E12.5 – E16.5) et condensation (E15.5 – E18.5). Il a enfin été démontré que le développement valvulaire se poursuivait après la naissance (14). Par la suite, la valve aortique s'ouvrira et se fermera en moyenne 3 milliards de fois au cours d'une vie humaine.

La valve aortique mature humaine, comportant 3 feuillets (ou *cusps*), est organisée selon une structure **trilaminaire** de la MEC, avec une **ventricularis** (*atrialis* au niveau des valves atrio-ventriculaires) riche en élastine sur le versant ventriculaire gauche (VG), une **spongiosa** riche en glycosamino-glycanes et une **fibrosa** riche en collagène sur le versant aortique. Durant l'embryogenèse, les cellules endothéliales migrent dans l'épaisseur de la valve (15) et y subissent la transition endothélium-mésenchyme pour y devenir des cellules de phénotype fibroblastique : les **cellules interstitielles de valve** (VIC : *valvular interstitial cells*).

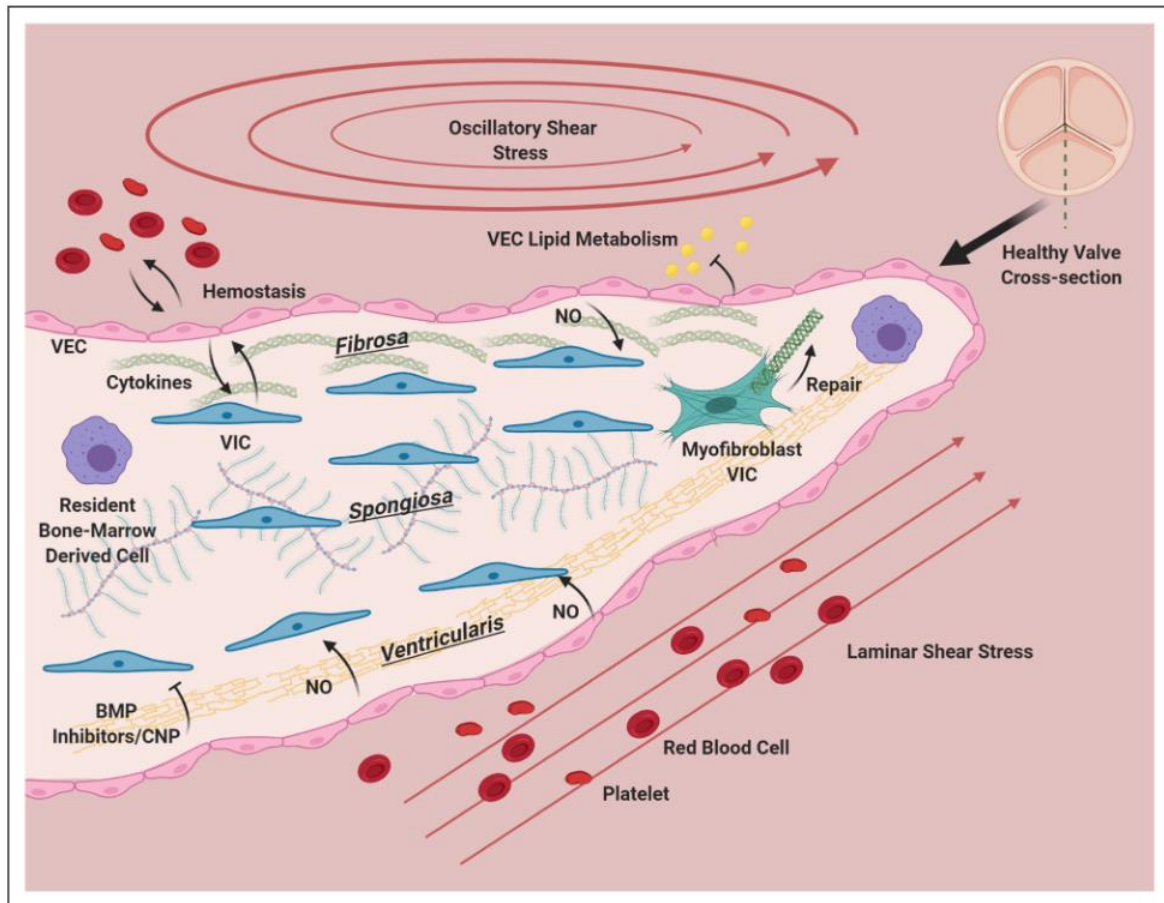


Figure 2. Valve aortique en homéostasie. Les 3 couches sont distinguées (fibrosa, spongiosa et ventricularis). Les VIC (valvular interstitial cells) sont le type cellulaire dominant et participent au remodelage de la matrice extracellulaire en adoptant un phénotype activé (myofibroblastique). Les VEC (valvular endothelial cells) maintiennent les VIC dans un état quiescent grâce à la voie du NO (oxyde d'azote) et communiquent avec les VIC par l'intermédiaire de cytokines. D'après Driscoll et al. *Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease*. *Circ Res.* 2021 128(9):1344–70. Avec la permission de Wolters Kluwer Health, Inc. (16)

Loin d'être une structure acellulaire, la valve aortique, composée de 3 feuillets (ou *cusps*), est donc une structure cellulaire et dynamique. Les feuillets aortiques restent cependant des structures avasculaires en situation physiologique, les échanges métaboliques se faisant par diffusion grâce à la fine épaisseur (millimétrique) des feuillets (17,18).

Trois types de VIC existent : les VIC **quiescentes** (dans une MEC peu remodelée), les VIC **activées** de type myofibroblastiques (dans une MEC très remodelée) et les VIC **ostéoblastiques** contribuant à l'ossification de la MEC. Dans une valve aortique saine, environ

90% des VIC sont quiescentes (versus < 10% de VIC activées) (19). La myofibrogenèse est un marqueur d'activation valvulaire et la proportion de VIC activées augmente significativement en situation pathologique. Cette activation myofibroblastique est caractérisée par une surexpression de l' α -smooth muscle actin (α -SMA) (15) et une organisation en fibres contractiles, en plus d'une capacité de synthèse d'enzymes participant au remodelage de la MEC : matrix métalloprotéinases (MMP) (principalement MMP-2), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) et cathepsines. En homéostasie, l'activation myofibroblastique des VIC est interrompue par l'apoptose et la dédifférenciation en VIC quiescentes.

En superficie, les feuillets aortiques sont recouverts d'une couche unique de cellules endothéliales. Ces **cellules endothéliales de valve (VEC : *valvular endothelial cells*)** ont un rôle protecteur vis-à-vis du tissu plus profond en régulant la perméabilité et l'inflammation et en prévenant la thrombose à la surface du feuillet. La contrainte de cisaillement (*shear stress*) provoquée par l'écoulement sanguin à la surface de la valve aortique est un facteur déterminant pour la fonction, le développement, l'homéostasie et éventuellement l'état pathologique des VEC en rapport avec une interaction paracrine avec les VIC.

Les VEC expriment davantage de **NO synthase endothéliale** (eNOS) sur le versant ventriculaire (20), versant où les calcifications ne surviennent pas, contrairement au versant aortique. Par ailleurs, les VEC porcines en coculture avec des VIC inhibent la différenciation myofibroblastique en l'absence de transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). Il existe ainsi un faisceau d'arguments tendant à démontrer que l'**interaction VIC-VEC** est nécessaire au développement et au maintien de l'homéostasie de la valve aortique. Une perturbation de cette interaction semble contribuer à la pathogénie et la calcification de la valve aortique (21).

3. Physiopathologie de la sténose valvulaire aortique

A. CALCIFICATIONS VALVULAIRES AORTIQUES

1. ANALOGIES AVEC L'ATHEROSCLEROSE

La pathologie valvulaire aortique calcifiante a été décrite pour la première fois par Johann Georg Mönckeberg en 1904 à Francfort sur le Main en Allemagne (22) et a longtemps été considérée comme un phénomène passif survenant avec le vieillissement. La compréhension de la physiopathologie de la SVA a connu beaucoup d'avancées depuis, avec une accélération de l'accumulation des connaissances sur le sujet depuis les années 2000 notamment grâce au décryptage du rôle des VIC (23,24). Il est désormais admis que la SVA est le résultat d'un processus actif ne consistant pas seulement en une calcification des feuillets aortiques.

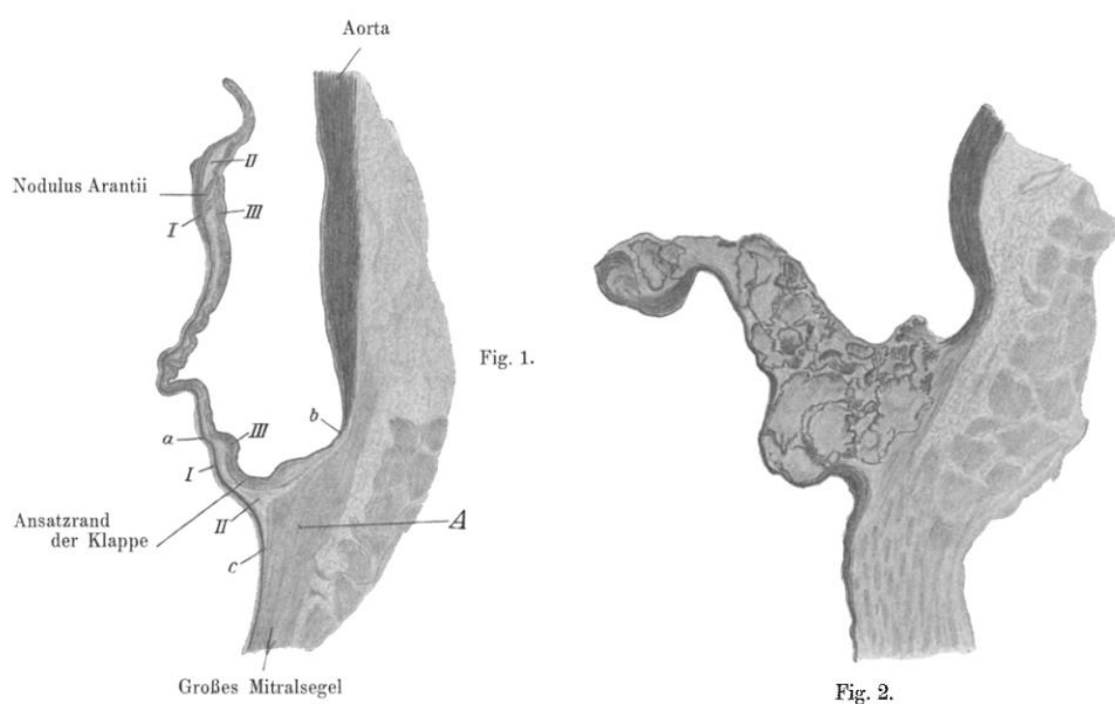


Figure 3. Première étude histopathologique de la pathologie valvulaire aortique calcifiante par J. G. Mönckeberg. Valve aortique normale (à gauche) et valve aortique sclérosée (à droite). D'après Mönckeberg. *Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen.* Virchows Arch path Anat. 1904;176(3):472–514. Avec la permission de Springer Nature. (22)

Comme mentionné précédemment, les VIC peuvent être activées et adopter un phénotype myofibroblastique sécrétant (25). Ce phénomène peut survenir durant le développement, en cas d'agression mécanique de la valve aortique (tel qu'un étirement) ou en situation pathologique. Les VIC activées ont la capacité de promouvoir la réparation valvulaire et de maintenir l'homéostasie, notamment grâce aux mécanismes de prolifération et de sécrétion de cytokines telles que TGF- β 1 et des MMP ainsi que de composantes de la MEC. La présence de TGF- β 1, une cytokine pro-inflammatoire et pro-fibrosante activatrice potentielle des VIC, a été mise en évidence dans les valves aortiques calcifiées pathologiques (26).

Par ailleurs, il a été montré que la **tension** imprimée par la diastole ventriculaire sur les feuillets aortique provoque un étirement des VIC (27), en particulier les VIC de la *fibrosa* qui se déforment plus que celles de la *ventricularis*. Cette déformation différentielle des VIC expliquerait en partie le fait que l'activation myofibroblastique et les lésions pathologiques surviennent préférentiellement au niveau de la *fibrosa* (versant aortique), ce qui est constaté à l'occasion des résections de valves aortiques calcifiées lors des procédures de RVA (28,29). Un effet synergique de la tension pariétale avec le TGF- β 1 a en plus été retrouvé sur l'expression d' α -SMA (et donc l'activation) des VIC.

L'évolution de la SVA calcifiée peut être scindée en 2 phases qui ont des caractéristiques immunologiques, métaboliques, mécaniques et cellulaires propres. La première phase (initiation) est marquée par une activation endothéliale et plaquettaire, un dépôt lipidique et une inflammation des feuillets valvulaires (30). La seconde phase (propagation) est caractérisée par une différenciation ostéogénique et une calcification responsables de la progression de la maladie (sclérose aortique puis sténose aortique). Dans la SVA, environ 13% des valves calcifiées réséquées présentent un authentique remodelage osseux hétérotopique

avec ostéoblastes et ostéoclastes tandis que 83% d'entre elles présentent une calcification diffuse (31).

Dans le détail, des similitudes sont retrouvées entre la pathogenèse des calcifications valvulaires aortiques et celle de l'athérosclérose. Des perturbations précoces au niveau de la couche endothéliale des feuillets valvulaires aortiques (sur le versant aortique/vasculaire) ont été mises en évidence et sont comparables aux phénomènes survenant au stade précoce de l'athérosclérose : association d'une rupture de barrière endothéliale à une inflammation, un dépôt lipidique et une activation de la coagulation. Ces phénomènes précoces sont suivis d'une réorganisation de la MEC via les MMP, causant un épaissement valvulaire (stade de ScA). Les feuillets sont ensuite le siège d'une infiltration par les cellules immunitaires, en particulier les macrophages de type M1 dont le rôle pro-calcifiant sur les VIC a été démontré (32). A cela, s'ajoute le fait que la communication entre les macrophages et les VIC semble être bidirectionnelle avec un potentiel modulateur des VIC sur les macrophages M1 (33). La néo-angiogenèse est aussi un processus déterminant (34), alors que les feuillets valvulaires sont censés être des structures avasculaires. D'ailleurs, ces mécanismes sont concomitants au dépôt de lipides issus de la circulation, à la production de protéoglycanes et l'accumulation de débris cellulaires issus de l'apoptose au sein de la valve aboutissant à la déformation des feuillets. La calcification de la matrice valvulaire représente la dernière étape de la pathogénie, achevant l'épaississement et la rigidification de la valve aortique et créant un obstacle à l'éjection ventriculaire gauche (stade de SVA). Le processus pathologique est alors entretenu par l'augmentation de la contrainte de cisaillement aggravée par l'obstacle valvulaire.

Il est à noter que les similitudes à l'échelle moléculaire et cellulaire entre SVA et athérosclérose se vérifient également au niveau des facteurs de risque (35) : sexe masculin, tabagisme, diabète, hypertension artérielle, hypercholestérolémie et syndrome métabolique.

Certaines équipes ont également retrouvé une différence entre les sexes masculin et féminin dans la prévalence de la maladie et au niveau de la calcification valvulaire aortique : les hommes sont ainsi plus à risque de développer une SVA et ont des scores calciques plus élevés à SVA équivalente par rapport aux femmes (36), chez qui les lésions fibreuses sont plus importantes que les lésions de calcification histologiquement (37). Les hormones sexuelles peuvent expliquer en partie ces différences car il a été démontré par exemple que les androgènes jouent un rôle important dans la formation osseuse et dans la régulation de l'activité des ostéoblastes et ostéoclastes.

2. BICUSPIDIE AORTIQUE

La bicuspidie aortique (BA) est un facteur de risque majeur de SVA (et d'insuffisance aortique dans une moindre mesure). Il s'agit d'une malformation congénitale touchant environ 1 à 2% de la population générale (38), ce qui en fait la malformation cardiaque congénitale la plus fréquente. La BA consiste en une anomalie de la valve aortique qui est formée de 2 feuillets plus ou moins équilibrés au lieu de 3, et pour laquelle la dernière nomenclature internationale a distingué 3 types (fusionné, à 2 sinus et partiellement fusionné) et plusieurs sous-types (39). L'ouverture et la fermeture non physiologiques et non équilibrées de la valve aortique sont responsables d'une augmentation de la tension pariétale sur les feuillets, favorisant vraisemblablement l'activation de mécanismes physiopathologiques impliqués dans la SVA et détaillés ci-dessous.

L'origine de cette malformation est probablement plurifactorielle mais a été élucidé en grande partie en 2005 grâce à l'identification de mutations du gène Notch1 (40). Une anomalie de la migration des cellules de la crête neurale durant l'embryogenèse peut aussi être responsable de cette malformation (41).

La SVA sévère est d'évolution plus rapide chez les patients porteurs d'une BA en comparaison avec les patients dont les valves aortiques sont tricuspides, comme en témoigne l'âge plus jeune auquel ces patients sont opérés d'un RVA (42). Il est également connu que la prévalence de la BA diminue avec l'âge lors du RVA (42). Le ratio BA/valve aortique tricuspide a évolué à la baisse au fur et à mesure du temps en raison du vieillissement de la population et donc de l'augmentation de la prévalence de la SVA sur valve tricuspide (43). Ainsi, la BA est retrouvée dans environ 1 valve aortique remplacée sur 3 dans le cadre de la SVA pure dans les cohortes plus récentes (43,44).

3. VOIES DE SIGNALISATION

Les différents processus pathologiques (inflammation, dépôt lipidique, angiogenèse, calcification etc.) observés dans la SVA sont le reflet de l'activation de diverses voies de signalisation dont certaines sont incomplètement élucidées voire encore inconnues. La plupart des mécanismes connus à ce jour sont synthétisés dans la **Figure 4**.

Superfamille des TGF- β

Les cytokines de la superfamille des TGF- β s sont des protéines dimériques et comptent une trentaine de membres, parmi lesquels la famille des TGF- β , les activines, les inhibines, les

bone morphogenetic proteins (BMP), des facteurs de croissance et de différenciation (GDF : *growth/differentiation factors*) et l'hormone anti-Müllerienne (AMH : *anti-Müllerian hormone*). Dans cette superfamille, les groupes des TGF- β et des BMP sont les plus impliqués dans le développement de la valve aortique normale mais également dans la pathogénie de la valve aortique calcifiée.

Groupe des transforming growth factors β

Les TGF- β agissent comme inhibiteurs de croissance pour la plupart des types cellulaires et induisent l'apoptose des cellules épithéliales, d'où leur implication dans l'oncogenèse en cas de déficit. A l'inverse, ces peptides ont aussi la capacité de stimuler la production de protéines de la MEC, et donc d'avoir des propriétés pro-fibrosantes. Ces facteurs sont au nombre de 3 chez l'homme (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3) et participent largement à la valvulogenèse pendant la période embryonnaire. Par exemple, une extinction du gène (KO) de TGF- β 2 (dont le rôle est déterminant pendant les périodes embryonnaire de transition endothélium-mésenchyme et du remodelage) chez la souris entraîne un épaississement valvulaire (45). Dans la maladie valvulaire aortique calcifiante, le **TGF- β 1** est l'isoforme dont le rôle est prédominant. Le TGF- β 1, présent dans la MEC à l'état physiologique, induit la phosphorylation et la translocation nucléaire de Smad2/3 par l'intermédiaire des récepteurs TGF- β et l'expression des gènes pro-myofibroblastiques, parmi eux et en particulier α -SMA (46,47) (typique des VIC activées). En plus de l' α -SMA, l'expression d'une douzaine de protéines dont des cadhérines, la vimentine, la fibronectine, des collagènes, des MMP et des TIMP est augmentée dans les myofibroblastes, qui ont donc des propriétés d'adhésion, de production de médiateurs pro-fibrotiques et de remodelage de la MEC environnante. En plus d'être

promus par le TGF- β 1, les myofibroblastes expriment eux-mêmes le TGF- β 1 et son récepteur, amplifiant ainsi leur propre activation et entraînant potentiellement une production pathologique de MEC.

La présence du TGF- β 1 a été retrouvée dans les valves aortiques pathologiques (26). En revanche, son rôle dans la promotion de la calcification des VIC aortiques est discuté et semble plus complexe dans la mesure où des résultats contradictoires ont été publiés. Dans un modèle murin, la répression du TGF- β 1 atténue la progression de la SVA (48) et l'addition de TGF- β 1 promeut la calcification des VIC en culture chez l'homme (26). A l'inverse, d'autres auteurs n'ont pas retrouvé de promotion ostéoblastique du TGF- β 1 dans les VIC mais un **rôle pro-fibrosant**, et ont expliqué leurs résultats notamment par la configuration de leur milieu de culture en 3 dimensions, donc plus physiologique pour l'étude des interactions au sein de la MEC (49). L'intérêt d'un milieu en 3 dimensions avait été démontré par d'autres auteurs précédemment (50).

Groupe des bone morphogenetic proteins

Les BMP ont initialement été identifiées comme promotrices des tissus osseux et cartilagineux en situation physiologique. Comme les TGF- β dont elles sont très proches de par leur séquence protéique, les BMP sont des facteurs de croissance peptidiques impliqués dans la valvulogenèse, notamment dans la formation des coussins endocardiques et leur signalisation est similaire à celle du groupe des TGF- β : les BMP activent Smad1/5/8 par l'intermédiaire des récepteurs BMPR.

Les **BMP-2 et BMP-4** ont été très étudiés dans le champs du développement cardiovasculaire (51) et leur expression a été retrouvée chez l'embryon au niveau valvulaire. Durant le développement, il a été démontré qu'il existait une synergie de la signalisation de la voie des BMP avec celle des TGF- β : notamment le BMP-2 renforce les modifications induites par la signalisation via le TGF- β 3 dans le cadre de la transition endothélium-mésenchyme (52). Cette synergie se retrouve également en pathologie osseuse, avec un effet stimulant sur la calcification de l'association TGF- β 1 – BMP-2 dans un modèle animal (53) et sur les VIC humaines (54). Quant à BMP-4, une cytokine pro-inflammatoire et pro-ostéogénique, sa présence a été retrouvée de manière préférentielle sur le versant aortique dans les valves saines (55), tout comme l'activation de Smad1/5/8 (56).

Voie de Notch

La voie de Notch est une cascade de signalisation permettant la détermination du lignage cellulaire. Chez les mammifères, il existe 4 récepteurs Notch (1 à 4) et 5 ligands Notch : delta-like (Dll) 1, 3 et 4 et Jagged (Jag) 1 et 2. La signalisation de Notch comporte 3 étapes : liaison ligand-récepteur au niveau de la membrane cellulaire, libération du domaine intracellulaire de Notch (*Notch intracellular domain*, NICD) et translocation nucléaire du NICD en tant que facteur de transcription.

Comme les TGF- β et les BMP, la signalisation par la voie de Notch est décisive dans la formation de la valve aortique chez l'embryon et un dérèglement de cette voie participe à la pathogénie de la valve aortique chez l'adulte. En plus de cela, une coordination de la voie de Notch avec celles des TGF- β et BMP est nécessaire pour le développement embryonnaire de

la valve aortique (57), en particulier pour la transition endothélium-mésenchyme (rôle de Notch1, exprimé dans les VEC).

En homéostasie, il a été démontré que Notch1 a un effet anti-ostéogénique dans les VIC en réprimant la transcription de Runx2. En pathologie, il faut signaler que la première mutation génétique mise en évidence dans la BA était une mutation de Notch1 (40). De plus, une haplo-insuffisance de Notch1 est responsable d'une calcification valvulaire aortique. Ceci est vérifié dans des modèles *in vitro* (valves aortiques porcines) dans lesquels une inhibition de Notch accélère la calcification alors qu'une stimulation atténue cette calcification. Les calcifications valvulaires aortiques induites par une altération de la signalisation de Notch semblent être dépendantes d'un mécanisme lié à Sox-9, qui est un facteur de transcription protecteur vis-à-vis des calcifications valvulaires aortiques (58). En parallèle, d'autres travaux ont démontré que Notch1 cible BMP2 en diminuant sa signalisation. Une diminution de la production de NO au niveau des VEC dysfonctionnantes semble être à l'origine de la diminution du signal Notch1 dans les VIC et participe donc à l'activation des VIC (59).

Voie Wnt (wingless-related integration site)/ β -caténine

La voie de signalisation Wnt/ β -caténine joue un rôle majeur dans la valvulogenèse (transition endothélium-mésenchyme (60)) et la promotion de caractéristiques ostéogéniques dans les VIC, et présente des interconnexions avec la voie de Notch. Plus précisément, NICD est capable de réduire l'activité du facteur de transcription de la β -caténine (61). De plus, Wnt3a, l'un des principaux activateurs de la voie Wnt, est fortement exprimé dans les valves aortiques atteintes de calcification, en lien avec TGF- β 1 (62).

Dans la voie de signalisation classique (canonique), la liaison d'un ligand à un couple de récepteurs, LRP5/6 et Frizzled, inactive le complexe qui retient la β -caténine. Ce complexe protéique est composé de l'*adenomatous polyposis coli*, de l'axine et de la glycogène synthase kinase 3 β , et phosphoryle la β -caténine pour cibler cette protéine vers le protéasome en vue de sa dégradation (63). Une augmentation des ligands de Wnt permet alors à la β -caténine de se déplacer vers le noyau cellulaire, induisant l'expression de BMP-2 (64). BMP-2 se lie à ses récepteurs (BMPR1 et BMPR2) et déclenche la voie de signalisation des Smad, déclenchant un programme cellulaire favorisant la formation osseuse, y compris la transcription de MSX2, qui est un activateur positif de la voie Wnt. Il est important de noter que l'expression de BMP-2 peut être augmentée par divers stimuli, notamment des cytokines pro-inflammatoires et des produits lipidiques oxydés (65). Enfin, des recherches récentes suggèrent que la voie Wnt non canonique, impliquant les ligands Wnt5a, Wnt5b et Wnt11, pourrait également jouer un rôle dans ces processus (66).

Runx-related transcription factor 2 (Runx2)

Les Runx sont des facteurs de transcription et sont au nombre de 3. Runx1 et Runx3 sont impliqués dans l'hématopoïèse/angiogenèse et l'oncogenèse (suppresseur de tumeur) respectivement (67). Runx2, aussi dénommé *polyomavirus enhancer binding protein-2 a subunit A* (PEBP2aA) ou *core binding factor-a 1* (Cbfa1), est le régulateur transcriptionnel principal de la lignée ostéoblastique et son expression marque l'adoption d'un phénotype ostéoblastique par la cellule. Presque toutes les cellules interstitielles ont un potentiel de différenciation ostéoblastique sous l'effet de stimuli adaptés et les VIC n'y font pas exception.

Une des finalités de l'activation des voies de signalisation par les groupes des TGF- β (en particulier TGF- β 1) et des BMP (en particulier BMP-2) dans les VIC est la transcription du gène de Runx2 et donc la promotion de la différenciation ostéoblastique (VIC ostéoblastiques). En situation pathologique, les TGF- β s activent Runx2 par 2 voies : la voie canonique (par les protéines Smad) et la voie non canonique (par p38 *mitogen-activated protein kinase*/MAPK). En situation physiologique, la voie de Notch inhibe la transcription de Runx2 (cf supra). Un déficit de la signalisation de Notch favorise ainsi la transcription de Runx2. Runx2, facteur essentiel de la différenciation ostéoblastique et impliqué dans les 2 voies de signalisation majeures de la calcification valvulaire (TGF- β et Notch), représente donc un marqueur déterminant pour l'étude de la SVA, que ce soit *in vitro* ou *in vivo*.

Autres implications moléculaires

Lipides

Des similitudes histopathologiques existent entre la calcification de la valve aortique et l'athérosclérose. Le dépôt lipidique fait partie de la phase précoce du développement de la SCA à la faveur d'une dysfonction endothéliale au niveau des VEC. Les effets de régimes lipidiques ou de modulation par les statines (ou inhibiteurs de l'HMG-CoA réductase) ont été étudiés *in vitro* et *in vivo* dans la pathologie valvulaire tant sur le versant myofibroblastique que sur le versant ostéoblastique. Ainsi, l'expression d' α -SMA est augmentée dans la valve aortique des porcs suivant un régime riche en cholestérol (68). A l'inverse, son expression est inhibée par la pravastatine dans des cultures de VIC porcines (69). *In vitro* dans les VIC humaines, l'atorvastatine inhibe l'activité de la phosphatase alcaline et les voies induites par

TGF- β 1, TNF α et BMP4 (70) alors que la simvastatine inhibe la calcification induite par TGF- β 1 (71).

La **lipoprotéine A** (Lp(a)) est une lipoprotéine similaire aux LDL, avec quelques caractéristiques distinctives importantes (72). La Lp(a) est synthétisée par le foie et possède des propriétés pro-inflammatoire et pro-calcifiante via les phospholipides oxydés (oxPLs) (73) qui transportent la Lp(a) dans la circulation (74). En plus de liens démontrés avec des pathologies athéromateuses telles que l'infarctus du myocarde et l'accident vasculaire cérébral ischémique, une association a été mise évidence entre les mutations génétiques de *LPA*, se traduisant par des taux circulants de Lp(a) élevés, et la SVA (75,76). Une étude sur des valves aortiques calcifiées a montré que la Lp(a) est localisée à proximité des calcifications en association avec ENPP2 (ou Autotaxine), une enzyme impliquée dans le métabolisme des phospholipides (77). Cette étude a montré que ENPP2 est transporté par la Lp(a), mais est également sécrétée par les VIC, entraînant la production d'acide lysophosphatidique (LysoPA), une petite espèce lipidique bioactive (78). Le LysoPA favorise la calcification des VIC isolées en culture et accélère le développement de la SVA dans un modèle murin transgénique (77). D'autres acteurs liés aux lipides comme le récepteur au lysoPA (LPAR1) ou les phospholipides phosphatases participent aux mécanismes aboutissant aux calcifications valvulaires. Dans l'ensemble, ces données soutiennent fortement l'hypothèse que la Lp(a) et les lipides favorisent la SVA par le biais du métabolisme des glycérophospholipides. A cela s'ajoute le fait que les taux de Lp(a) et d'oxPL sur l'apolipoprotéine B (oxPL-apoB) sont corrélés à la vitesse de progression de la SVA chez l'homme (79,80).

Hémostase et anticoagulation

De nombreuses études ont démontré l'intervention des éléments-clés de l'hémostase dans la pathogénie de la valve aortique (81). Une **infiltration plaquettaire** dans la valve survient à l'occasion d'un dysfonctionnement de l'endothélium (VEC) notamment sous l'effet de contraintes mécaniques à la phase précoce, tout comme le dépôt lipidique et l'afflux de cellules inflammatoires. Une étude a montré que les plaquettes favorisent l'expression de gènes pro-calcifiants dans les VIC par le biais de la libération d'adénosine diphosphate, l'activation du récepteur purinergique P2Y1 et l'expression de l'ENPP2. À son tour, il a été démontré que ENPP2 se lie à la glycoprotéine IIb/IIIa sur les plaquettes, entraînant la libération de LysoPA avec des effets pro-calcifiants. Dans un modèle murin, l'administration intraveineuse de plaquettes activées a augmenté la progression hémodynamique de la SVA, ce qui a été inhibée par le blocage de LPAR1 (82).

La rupture de la barrière endothéliale permet aussi l'infiltration du **facteur von Willebrand** dans le feuillet et l'expression du **facteur tissulaire** (FT) sur le versant interne des VEC. D'ailleurs, notre équipe a montré que l'expression du FT et de l' α -thrombine de la valve aortique est associée avec la forme clivée de l'ostéopontine (83). L'hypothèse est que le FT peut être impliqué dans le processus de minéralisation des valves aortiques en favorisant la génération de la partie N-terminale pro-inflammatoire de l'ostéopontine par la génération de thrombine localement. L'ensemble de ces phénomènes favorise la différenciation des VIC quiescentes en VIC activées, qui vont ensuite entraîner un remodelage et une fibrose de la MEC, puis en VIC ostéoblastiques responsable de la formation de nodules osseux au sein de la valve. Les plaquettes jouent en plus un rôle déterminant en sécrétant du *vascular endothelial growth factor*, VEGF, bien connu pour induire la néoangiogenèse, qui est l'un des

mécanismes physiopathologiques majeurs impliqués dans la pathologie valvulaire aortique calcifiante. Par ailleurs, la promotion de l'angiogenèse n'est pas le monopole des plaquettes puisqu'il a été démontré *in vitro* que les VIC issues de valves aortiques humaines pathologiques ont aussi des propriétés pro-angiogéniques via VEGF (84).

L'implication de la vitamine K, acteur majeur de la coagulation, dans la pathogénie de la valve aortique calcifiée a été suggérée de longue date (85). Il existe ainsi des données issues de la modulation de la vitamine K sur les calcifications valvulaires aortiques. La **warfarine**, anticoagulant de la famille des antivitamines K, a un effet pro-calcifiant chez les rongeurs au niveau valvulaire (86,87). De plus, une association clinique chez l'homme a été retrouvée dans plusieurs études entre la prise de warfarine et l'accélération des calcifications valvulaires aortiques (88–90). Ces résultats sont en phase avec ceux d'une étude ayant retrouvé un effet ralentisseur du traitement par vitamine K sur la progression de la ScA (91). *In vitro*, la warfarine stimule l'activité ostéogénique des VIC dans les valves aortiques saines et pathologiques via *extracellular signal-regulated kinase 1 and 2* (ERK1/2), avec en plus un rôle de la signalisation via la β -caténine dans les VIC pathologiques (92).

Voie du complément

Le système du complément est un complexe de protéines régulatrices, de récepteurs membranaires et de protéines plasmatiques qui régulent chacune une réponse innée à l'inflammation et l'infection. En cas de perturbations, le complément peut médier des réponses délétères causant des pathologies immunitaires ou inflammatoires diverses. Il a été démontré que le complément stimule l'expression de Runx2 pour induire les actions pro-fibrogéniques des VIC via un mécanisme dépendant de ERK1/2 (93).

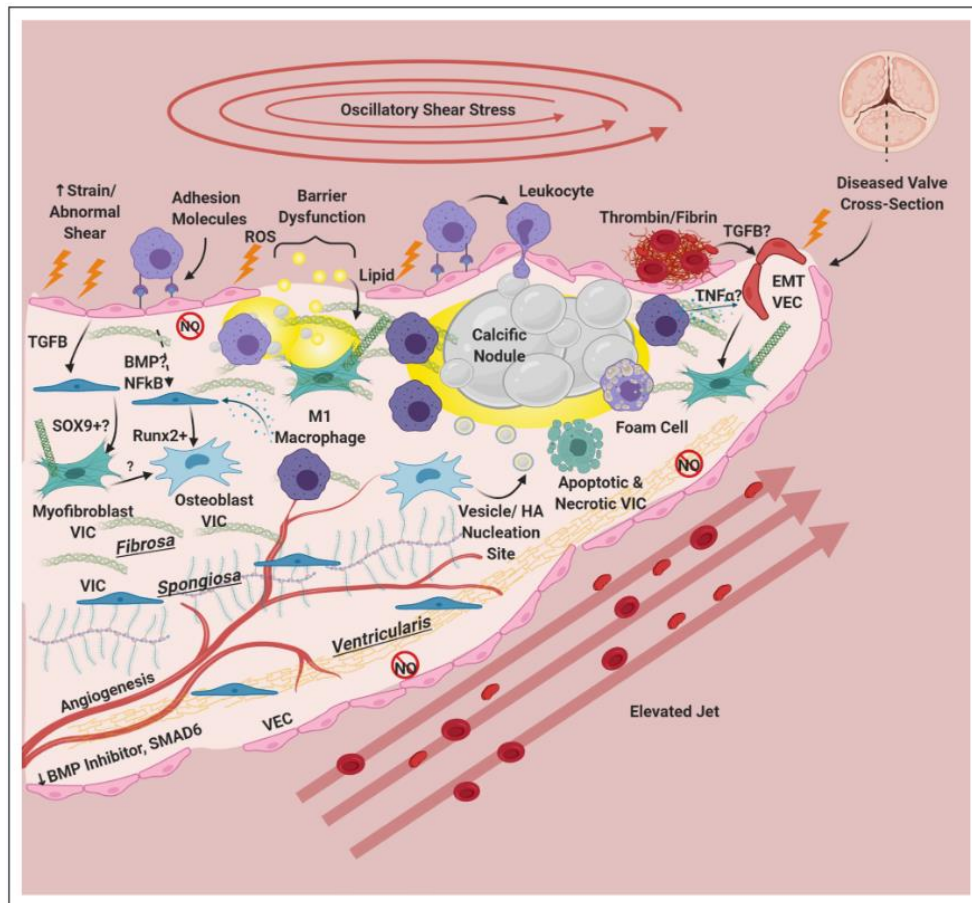


Figure 4. Valve aortique calcifiée en situation pathologique. D'après Driscoll et al. *Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease*. *Circ Res*. 2021 128(9):1344–70. Avec la permission de Wolters Kluwer Health, Inc. (16)

Approches novatrices

Des méthodologies se distinguant de l'étude traditionnelle de voies de signalisation singulières ont été utilisées ces dernières années en matière de recherche sur la pathologie valvulaire aortique calcifiante. Il s'agit de réaliser un criblage à haut débit d'un large éventail de molécules à différents stades de leur expression.

Etude d'association pangénomique (genome-wide association study, GWAS)

Une GWAS consiste en l'analyse des variations génétiques dans de très larges cohortes (94). Des GWAS centrées sur la SVA ont été réalisées, uniformes d'un point de vue ethnique (population d'ascendance européenne en l'occurrence (95)) ou non (96) : des mutations non codantes associées à des gènes particuliers ressortent de manière significative et récurrente. Ces gènes sont des marqueurs du métabolisme lipidique (en particulier la lipoprotéine(a)(75)), de l'inflammation, de la calcification et de l'obésité, renforçant d'avantage l'analogie avec l'athérosclérose.

Approche multi-omique

A une échelle de population beaucoup plus restreinte qu'une GWAS mais avec une méthodologie multimodale, des travaux ont été conduits selon une approche dite multi-omique (97,98) : génomique, épigénomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique. L'expression des facteurs potentiellement impliqués dans la SVA a été analysée avant et après transcription et après dégradation. Une étude a même réalisé des analyses en sous-groupes selon les stades de la maladie (valves saines, fibrosées et calcifiées) et selon les différentes couches des feuillets aortiques (*ventricularis*, *spongiosa* et *fibrosa*) (97) : dans cette étude, il existait une expression différentielle pro-inflammatoire dans la *fibrosa* et les valves pathologiques par rapport aux autres couches et par rapport aux valves saines. De même, les VIC provenant de la *fibrosa* ont un potentiel de calcification plus élevé que les VIC de la *ventricularis*.

En utilisant des banques publiques de données génétiques comme cela est aussi réalisé en approche multi-omique, des analyses en **bio-informatique intégrée** ont recherché des gènes dont l'expression est différenciée (differentially expressed genes, DEG). Les DEG se distinguant le plus fréquemment dans la SVA sont liés à l'inflammation et aux cellules immunitaires (macrophages, lymphocytes B etc.) (99–101).

B. CONSEQUENCES CLINIQUES

L'évolution du stade de ScA vers celui de SVA est imprévisible. Une estimation a cependant été réalisée qui estimait que chez les patients asymptomatiques atteints de SVA, l'augmentation moyenne annuelle de la vitesse maximale transaortique (V_{max}) et du gradient moyen transaortique était de 0.32 m/s et 7 mmHg respectivement et la diminution annuelle de la surface valvulaire aortique indexée de 0.12 cm²/m² (102). Dans cette même étude, la survie à 2 ans était de 21% lorsque la V_{max} initiale était supérieure à 4 m/s, 66% lorsque la V_{max} était comprise entre 3 et 4 m/s et 84% lorsque la V_{max} était inférieure à 3 m/s ($p < 0.0001$). Le **pronostic vital** est donc directement corrélé à la sévérité de l'obstacle à l'éjection à la sortie du ventricule gauche.

La **mort subite** survient à une fréquence de 1%/an chez les patients asymptomatiques atteints de SVA sévère (103). De plus, 70% des cas de mort subite chez les patients asymptomatiques ne sont pas précédés de symptômes dits classiques. Chez les patients symptomatiques, le taux de mort subite monte à 3% dans les 3 à 6 mois suivant le début des symptômes (104).

Le phénomène d'hypertrophie ventriculaire gauche (HVG) est connu de longue date et n'est que la conséquence d'une adaptation du myocarde à l'obstacle généré par la valve aortique sténosée. Cette HVG explique un des symptômes fréquents de la SVA qu'est l'angor d'effort

(presque 50%) par inadéquation entre les apports et la consommation en oxygène du myocarde hypertrophié. Les autres signes sont représentés par la syncope, la dyspnée d'effort (le plus souvent stades II et III de la New-York Heart Association, NYHA), l'insuffisance cardiaque (15% des patients) et la fibrillation atriale (10% des patients) (4).

La compensation par l'HVG est limitée dans le temps et est responsable d'une insuffisance cardiaque diastolique (fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG) conservée, trouble de la relaxation) dont la dilatation atriale gauche est le reflet. La dilatation atriale gauche a été identifiée comme facteur de mauvais pronostic dans la SVA (105). L'**insuffisance cardiaque** gauche systolique (FEVG diminuée, dilatation ventriculaire gauche) puis globale représente le dernier stade de la maladie. Enfin, une hypertension pulmonaire postcapillaire est fréquemment relevée (> 50%), dès le stade de SVA modérée ($V_{\max} \geq 3$ m/s, gradient moyen ≥ 20 mmHg, surface valvulaire ≤ 1.5 cm²), et sa sévérité est directement corrélée à la mortalité (106).

B. Traitement de la sténose valvulaire aortique

1. Traitement pharmacologique : essais thérapeutiques

Compte tenu des analogies avec l'athérosclérose tant à l'échelle moléculaire et cellulaire qu'au niveau des facteurs de risques cardiovasculaires, il existe un rationnel en faveur de la modulation des facteurs de risque cardiovasculaires modifiables tels que l'hypercholestérolémie dans la pathologie valvulaire aortique calcifiante. Aucun traitement pharmacologique n'a cependant fait la preuve de son efficacité dans la prévention ou le traitement de la ScA ou la SVA.

Des essais randomisés contrôlés ont été réalisés, en particulier avec les **statines**, seules ou en association avec un inhibiteur de l'absorption du cholestérol (ézétimibe), comme SALTIRE (Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression) (testant l'atorvastatine) (107), ASTRONOMER (Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin) (108), TASS (Tyrolean Aortic Stenosis Study) (testant l'atorvastatine) (109), SEAS (Simvastatin and Ezetimibe in Aortic Stenosis) (110) et PROCAS (Progression of Stenosis in Adult Patients With Congenital Aortic Stenosis) (testant la rosuvastatine) (111). Aucun de ces essais n'a cependant démontré de bénéfice sur la prévention ou le ralentissement de la pathologie valvulaire aortique calcifiante.

Via la perspective de la Lp(a) et d'oxPL-apoB, il n'existe pas non plus d'effet favorable des statines sur les taux de Lp(a) ou oxPL-apoB, et une augmentation des taux circulants a même été relevée (112). La **niacine** (ou vitamine B3) réduit les taux de Lp(a) et oxPL-apoB mais, en plus de n'avoir pas démontré de bénéfice vasculaire (maladie coronaire et accident vasculaire cérébral), des effets indésirables graves ont été constatés (HPS2-THRIVE : The Heart Protection Study 2–Treatment of HDL to Reduce the Incidence of Vascular Events) (113). Il n'existe donc pas de traitement médicamenteux agissant sur les taux de Lp(a) et oxPL dans le cadre des calcifications valvulaires aortiques.

Le rôle pharmacologique du système rénine-angiotensine-aldostérone (RAA) a été étudié dans la SVA. Les **inhibiteurs de l'enzyme de conversion** (IEC) inhibent la fragmentation de l'angiotensine I (inactive) en angiotensine II (active et vasoconstrictrice) et sont donc tout d'abord des antihypertensifs. Une diminution de la pression artérielle par les IEC pourrait donc être bénéfique dans le cadre de la SVA par diminution de la tension pariétale sur les feuillets valvulaires aortiques. De plus, l'angiotensine II augmente la production

d'interleukine 6 (inflammatoire) et la différenciation ostéogénique des VIC (114), et la présence d'une surexpression de l'enzyme de conversion a été mise en évidence dans les valves pathologiques (115). Ces derniers éléments tendraient donc à faire supposer l'existence d'un rôle potentiel des IEC sur le ralentissement de la SVA. Les résultats d'études rétrospectives (116) et d'essais cliniques (dont RIAS : Ramipril In Aortic Stenosis (117)) sont cependant contradictoires et réalisés sur des échantillons de patients trop faibles et ne permettent donc pas à ce jour de conclure à un intérêt des IEC dans la ScA ou la SVA.

Bien d'autres classes de médicaments ont été testées dans la SVA, fondés sur les mécanismes physiopathologiques connus impliqués dans la pathogénie : inhibiteur de la 5-phosphodiesterase (**sildénafil** (118), action sur la voie du NO) et **antivitamine K** (implication dans l'hémostase) notamment. Les résultats étaient contradictoires, non exploitables en raison de l'indication du traitement qui n'était pas la SVA comme dans le cas du sildénafil (étude hémodynamique et de la fonction ventriculaire) ou à cause d'effectifs trop faibles (cas de la vitamine K (91)).

Il faut également souligner l'effet paradoxal de certaines molécules dont les résultats cliniques vont à l'encontre du mécanisme moléculaire : par exemple, la cadhérine 11 est une protéine d'adhésion cellule-cellule et dont la surexpression a été retrouvée dans les valves humaines pathologiques (119). Aussi, un KO de la cadhérine 11 chez la souris empêche la calcification valvulaire aortique (120). L'hypothèse a donc été émise que le **célécoxib** (inhibiteur de la cyclo-oxygénase 2 avec une grande affinité pour la cadhérine) pourrait prévenir la survenue de SVA en saturant la cadhérine 11 (121). Cependant les mêmes auteurs ayant émis cette hypothèse ont retrouvé un effet paradoxal du célécoxib (122) : *in vitro* avec des VIC porcines, le célécoxib promeut la différenciation myofibroblastique et augmente la

calcification des VIC. De plus, en reprenant les dossiers médicaux électroniques de presque 7000 patients atteints de SVA, une association a été mise en évidence entre la prise chronique de célécoxib (pour douleurs arthritiques) et la SVA.

Des études précliniques et observationnelles suggèrent que le renouvellement osseux et la différenciation ostéoblastique des VIC sont des mécanismes contributifs importants. L'inhibition de ces voies par le **dénosumab** ou l'**acide alendronique** a été testée pour réduire la progression de la SVA. Dans le cadre d'un essai contrôlé randomisé monocentrique en double aveugle et en groupes parallèles (SALTIRE2 : Study Investigating the Effect of Drugs Used to Treat Osteoporosis on the Progression of Calcific Aortic Stenosis) (123), des patients âgés de plus de 50 ans présentant une SVA débutante (vitesse maximale > 2.5 m/s) ont été randomisés pour recevoir du dénosumab vs placebo ou de l'acide alendronique vs placebo. L'étude n'a révélé aucune différence entre le dénosumab ou l'acide alendronique et leur placebo à 24 mois sur la progression du score calcique de la valve aortique.

2. Traitements invasifs

A. INDICATIONS D'INTERVENTION

Les recommandations des sociétés savantes concernant le diagnostic et le traitement de la SVA sont très codifiées et régulièrement mises à jour : les dernières recommandations de l'European Society of Cardiology (ESC) / European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) en Europe datent de 2021 (9) et celles de l'American College of Cardiology (ACC) / American Heart Association (AHA) en Amérique du Nord de 2020 (10).

Une SVA est définie comme serrée lorsque la Vmax est supérieure à 4 m/s (équivalent à un gradient maximal de 64 mmHg), lorsque le gradient moyen est supérieur à 40 mmHg ou

lorsque la surface valvulaire ou surface valvulaire indexée est inférieure à 1 cm² ou 0.6 cm²/m² respectivement.

Des différences existent entre les recommandations européennes et américaines mais qui ne sont pas majeures en ce qui concerne le traitement de la SVA (124). En résumé, une intervention est recommandée sans réserve (**classe I**) par l'ESC/EACTS chez les patients :

- Symptomatiques atteints de :
 - SVA serrée (preuve de niveau B)
 - SVA à bas gradient (< 40 mmHg de gradient moyen) avec FEVG diminuée (< 50%) et persistance d'une réserve contractile (niveau B)
- Asymptomatiques atteints de :
 - SVA serrée avec FEVG diminuée (< 50%) (niveau B)
 - SVA serrée avec symptômes au test d'effort (niveau C)

Les modalités du traitement radical (remplacement valvulaire aortique chirurgical ou TAVI/*transcatheter aortic valve implantation*) sont également définies (classe I) :

- Remplacement valvulaire aortique chirurgical chez les patients de moins de 75 ans et à bas risque chirurgical (niveau B)
- TAVI chez les patients de plus de 75 ans ou à haut risque chirurgical ou contre-indiqués à la chirurgie (niveau A).

B. MODALITES D'INTERVENTION

La **chirurgie** conventionnelle de RVA a été initiée il y a 7 décennies aux Etats-Unis (en 1954) avec des prothèses mécaniques à bille (125), grâce aux débuts et aux progrès de la circulation

extracorporelle et de la protection myocardique. L'introduction des bioprothèses a été réalisée pour la première fois avec succès en France une décennie plus tard (en 1965) (126). Quel que soit le substitut, l'intervention consiste à réséquer la valve aortique pathologique à travers une aortotomie et à implanter un substitut valvulaire au niveau de l'orifice aortique natif. La sternotomie médiane reste la voie d'abord de référence pour cette intervention, bien que des alternatives par voie mini-invasives (ministernotomie supérieure, mini-thoracotomie antérieure droite et mini-thoracotomie axillaire droite) aient été développées et popularisées au cours des 2 dernières décennies (127). Les substituts valvulaires implantables par chirurgie ouverte sont principalement représentés par les bioprothèses aortiques (péricarde bovin ou valves aortiques porcines, c'est-à-dire systématiquement des xélogreffes) (128) et les prothèses mécaniques. Les autres substituts ont des indications certes anciennes mais plus restreintes : homogreffe aortique (129) (principalement en cas d'endocardite infectieuse) et autogreffe pulmonaire (ou intervention de Ross (130), réalisée en particulier chez l'enfant et l'adulte jeune).

Le **TAVI**, mis au point en France (à Rouen) et décrit pour la première fois en 2002 (131), surpasse actuellement la chirurgie conventionnelle en nombre d'interventions réalisées annuellement (132–134). Il s'agit de déployer par cathétérisme interventionnel en position orthotopique une bioprothèse valvulaire, sans extraire la valve aortique native. Les voies d'implantation possibles sont les voies transfémorale, transcarotidienne, transaxillaire et transapicale (nécessité de minithoracotomie antérieure gauche dans ce dernier cas).

De par la catégorie d'âge concernée par la SVA et l'augmentation du nombre de TAVI, la part d'implantation des bioprothèses a drastiquement augmenté au cours des dernières années par rapport à celle des prothèses mécaniques (135,136), avec un taux de mortalité précoce

faible et équivalent entre le RVA(137,138) et le TAVI(139) à environ 2.5%. Il existe néanmoins des recommandations quant au **choix des substituts valvulaires**. Les recommandations européennes de classe I sont les suivantes (9) :

- Une prothèse mécanique est recommandée suivant le souhait d'un patient informé et en l'absence de contre-indication à une anticoagulation au long cours (niveau C)
- Une prothèse mécanique est recommandée chez les patients à risque de détérioration structurelle de valve (niveau C)
- Une bioprothèse est recommandée suivant le souhait d'un patient informé (niveau C)
- Une bioprothèse est recommandée en cas de risque d'anticoagulation inefficace, de contre-indication à l'anticoagulation à cause d'un haut risque hémorragique et chez les patients dont l'espérance de vie est inférieure à la durabilité supposée de la bioprothèse (niveau C)
- Une bioprothèse est recommandée en cas de réopération pour thrombose de prothèse mécanique.

C. Problématique des bioprothèses valvulaires

En plus de la complication redoutée et commune avec les prothèses mécaniques représentée par l'endocardite infectieuse prothétique, les bioprothèses sont le siège d'une détérioration structurelle (***structural valve deterioration* ou SVD**) inéluctable aboutissant à terme à la dysfonction sous la forme d'une sténose et/ou d'une régurgitation de sévérité variable (140,141). Selon les dispositifs, la durabilité des bioprothèses est potentiellement de 17 ans en position aortique (142) et 14 ans en position mitrale (143). Cependant, le retrait récent (en juillet 2023) d'un modèle de bioprothèse aortique largement diffusé en raison d'un taux de

SVD précoce élevé après une alerte de la Food and Drug Administration (FDA) (144) rappelle l'intérêt de la matériovigilance et la nécessité de poursuivre les recherches dans le domaine encore incomplètement élucidé de la SVD (145).

Une lésion quasi-constante dans la SVD est la calcification des feuillets des bioprothèses aortiques. A cela s'ajoute un remodelage tissulaire et une inflammation, rappelant de ce fait le processus de calcification des valves natives ou encore celui de l'athérosclérose (146). Les anomalies de conception du dispositif ou la thrombose des feuillets (bien que ce dernier phénomène soit rare) sont des facteurs contribuant à la dégradation des bioprothèses. En raison de l'origine animale des composants (xénogreffe), la piste immunologique a été également étudiée pour expliquer la détérioration des bioprothèses.

En particulier, les recherches se sont focalisées sur la réaction immunitaire aux **glycanes** présents dans les tissus des bioprothèses (147–149). Ainsi, il a été mis en évidence que les antigènes, notamment un xénoglycane déterminant, la galactose- α 1,3-galactose (α Gal), continuaient d'être exprimés à la surface des bioprothèses manufacturées malgré un prétraitement par la glutaraldéhyde (148) et même dans des valves ayant subies un processus de décellularisation dans le cadre de l'ingénierie tissulaire (150). L' α Gal est exprimée chez tous les mammifères à l'exception de l'espèce humaine et des primates de l'Ancien Monde, et est largement responsable des rejets hyperaigus d'organe après xénotransplantation (151). Il a été démontré récemment que les réactions anti- α Gal et anti-acide N-glycolylneuraminique (anti-Neu5Gc) jouaient un rôle clé dans la SVD chez l'homme (152). Les résultats de cette dernière publication (portant sur les bioprothèses implantées par RVA et par TAVI) au niveau d' α Gal sont concordants avec ceux d'une étude n'ayant inclus que des

patients ayant bénéficié d'un TAVI (153) et une autre réalisée dans un modèle animal d'implantation de disque péricardique sous-cutané (154).

Enfin, encore dans le cadre de l'immunologie, il existe des résultats contradictoires à propos de l'influence du groupe sanguin des patients opérés (notamment sur l'effet protecteur du groupe A) sur la durabilité des bioprothèses (155,156).

Chapitre 2 – Modèles animaux de calcifications valvulaires

L'étude de la SVA est riche de travaux *in vitro* avec des VIC aortiques porcines et humaines (cf Chapitre 1). Afin de tester et confirmer les différentes hypothèses au niveau des voies de signalisation, de nombreux modèles animaux de calcification cardiovasculaire *in vivo* ont été utilisés. Il faut rappeler cependant que, contrairement à l'homme, aucune espèce animale ne développe de SVA à l'état naturel, et qu'en expérimentation animale les calcifications sont provoquées ou accentuées par des manipulations génétiques, mécaniques, diététiques ou immunologiques.

A. Modèles petits mammifères

1. Souris

Les modèles expérimentaux de calcification valvulaire aortique sont nombreux chez la souris, responsables de BA (157) ou non. Il existe une multitude de KO (exemple : apolipoprotéine E/apoE, LDL-récepteur etc.), souvent combinés avec des régimes athérogènes (158). Par exemple, des auteurs ont étudié des souris **déficientes pour le récepteurs au LDL (Ldlr/-)** (159). Ces souris ont été soumises à un régime riche en graisses et en glucides pendant 4 mois,

induisant un syndrome métabolique, une SVA précoce et des anomalies au niveau des valves aortiques. Les résultats de cette étude suggèrent que des facteurs athérogènes couramment observés chez l'homme, tels que l'obésité, l'hyperglycémie et la dyslipidémie, jouent un rôle important dans le développement de la maladie valvulaire aortique calcifiante. Par la suite d'autres combinaisons génétiques ont été testées comme des souris LDL-récepteur déficientes exprimant uniquement l'apolipoprotéine B-100 (LDLr(-)/ApoB(100/100)). Après 20 mois, ces souris développent une SVA sévère, une HVG et des calcifications valvulaires (160). Afin d'améliorer ce modèle, une composante diabétique a été ajoutée : génération de souris LDLr(-)/ApoB(100/100)/IGF-II. Ces souris ont été soumises à un régime riche en graisses, sucres et cholestérol pendant 6 mois, entraînant une SVA avec calcification des valves et une inflammation. Cette étude a également montré une régulation de gènes associés à l'hypertrophie cardiaque et à l'ostéogenèse (161). Toujours ciblant les lipides, mais avec une autre mutation, certaines équipes ont utilisé des modèles de souris ApoE-déficientes pour étudier la SVA. Ces souris développent des inflammations similaires à celles observées chez l'homme, ainsi que des calcifications nodulaires et des augmentations significatives des vitesses transvalvulaires (162,163).

La présence d'une BA est fortement associée à un risque accru de SVA. La **voie de Notch** est impliquée dans le développement de la valve aortique, et des études sur des souris ont examiné le rôle de Notch et de ses effecteurs dans le développement embryonnaire de la valve aortique. Chez les souris, l'absence totale de Notch1 conduit à des défauts vasculaires létaux, mais les souris hétérozygotes pour Notch1 (Notch1+/-) nourries avec un régime riche en cholestérol présentent une calcification valvulaire 5 fois supérieure à celle des souris témoins. Cependant, l'incidence de la BA chez les souris Notch1+/- est faible, avec des taux variables selon les études (164). Par ailleurs, une absence de la périostine entraîne une

suppression de la signalisation Notch1, une régulation à la hausse de gènes liés à l'ostéogenèse et une calcification de la valve aortique chez les souris (165). La suppression d'eNOS dans les souris est associée à des BA et une calcification. Chez les souris eNOS+/-, 27% à 42% des individus naissent avec des valves aortiques bicuspidées (166). Aussi, la présence d'athérosclérose est réduite chez les souris eNOS-/-, possiblement en raison d'une diminution de l'oxydation du cholestérol (167). Enfin, le rôle de GATA5, régulant les voies de Notch et de l'eNOS, a été étudiée : la suppression de Gata5 chez les souris conduit à la formation de valves bicuspidées et à une fonction valvulaire altérée (168).

Un autre modèle connu et maîtrisé de calcification valvulaire aortique chez la souris est fondé sur l'agression mécanique de la valve aortique par cathétérisme interventionnel, provoquant une rupture de la barrière endothéliale qui initie un processus pathologique au sein de la valve (169).

2. Rat

Le rat peut également servir de modèle d'étude, bien que les modèles de calcification sur valves aortiques natives soient peu nombreux et aient été peu utilisés, fondés sur l'induction d'une insuffisance rénale (170,171) ou non (87,172). Pour l'étude de la valve native, l'inconvénient majeur chez le rat est la **différence de structure de la valve aortique, qui n'est pas trilaminaire** (173) comme chez l'homme ou chez d'autres espèces telles que la souris (174), le lapin (175), le mouton (176) ou le cochon (177). La méthodologie chez cet animal consiste donc le plus souvent à reprendre le **concept ancien d'implantation de biomatériaux hétérologues chez les rongeurs et lagomorphes en position sous-cutanée** (donc hétérotopique) (178), dont le péricarde bovin utilisé pour la confection des bioprothèses

valvulaires ou de certains cœur artificiels totaux (179–182) et les valves aortiques porcines (183,184).

3. Lapin

Les régimes athérogènes sont à la base de la plupart des modèles de ScA chez le lapin (175,185) (en particulier le lapin blanc néo-zélandais), où la **vitamine D2** a parfois été associée au **régime hypercholestérolémique** (186,187) pour créer des lésions de ScA. La compréhension de la place du FT dans les calcifications valvulaires aortiques a par exemple été enrichie par l'étude d'un modèle de ScA chez le lapin dans notre unité de recherche (187). Par le passé, le lapin a aussi été utilisé comme hôte de biomatériaux sous-cutanés avant l'avènement du modèle d'implantation chez le rat (179).

En plus de leur faible coût relatif, les modèles petits mammifères se distinguent par leur facilité de manipulation (notamment génétique chez la souris). Cependant, en ce qui concerne l'étude des dispositifs implantables, la faible complexité de la manipulation chirurgicale est contrebalancée par l'impossibilité d'étudier le fonctionnement et l'évolution des substituts valvulaires en position de fonction en raison de la taille des spécimens, d'où le recours aux expérimentations chez les grands mammifères.

B. Modèles grands mammifères

1. Cochon

Contrairement aux petits mammifères, il existe très peu de modèles de calcification valvulaire aortique chez les grands mammifères. En dehors des primates chez lesquels les expérimentations animales ne sont pas autorisées sauf exception, le cochon est le grand mammifère se rapprochant le plus de l'homme, de par l'anatomie de la valve aortique et de par son métabolisme général et notamment lipidique. La valve aortique et la racine aortique porcines ont des configurations et proportions identiques à celles de l'homme, à tel point qu'elles peuvent être implantées quasiment telles quelles en pratique clinique (bioprothèse Freestyle™ Aortic Root, Medtronic, Minneapolis, MN, USA). De plus, même si le cochon ne présente pas de SVA à l'état naturel, des lésions d'athérosclérose et de ScA se développent avec l'âge chez cet animal. Il existe des modèles de ScA accentuée chez le cochon reposant sur le suivi d'un **régime hypercholestérolémique** pendant plusieurs mois (177,188). Des lésions très précoces de ScA peuvent également être induites par un modèle d'hypercholestérolémie familiale (189).

2. Mouton : xénogreffes valvulaires

En dehors du cochon, il n'existe pas de modèle de calcification sur valve aortique native chez les grands mammifères. En revanche, le mouton a été très utilisé pour **tester la fonction et la durabilité des bioprothèses manufacturées** au niveau de toutes les valves : remplacements valvulaires aortique (190,191), pulmonaire (192–194), mitral (195–197) et tricuspide (198,199). Il faut préciser que, sans doute pour des raisons de complexité chirurgicale, les bioprothèses testées dans la circulation systémique en position éjectionnelle (équivalent de

la valve aortique) ont souvent été implantées en position hétérotopique (shunt apico-aortique (200) et aorte descendante (201–203)). Le mouton a également été l'animal préférentiellement utilisé en **ingénierie tissulaire** (204) valvulaire : de nombreux essais autour de la décellularisation et de la recellularisation de valves aortiques ou pulmonaires porcines (xénogreffes) ont été réalisés dans des modèles ovins. Bien qu'il n'y ait pas eu de résultats positifs jusqu'à présent (205–211), une calcification accélérée des xénogreffes valvulaires porcines est observée en quelques semaines, en particulier pour les substituts non manufacturés.

La gestion des grands mammifères est plus coûteuse que celle des petits mammifères et par conséquent, les expérimentations ne peuvent souvent pas être réalisées sur des effectifs larges. Cependant, le mouton est de longue date l'animal de référence pour l'**étude de la SVD** des bioprothèses manufacturées ou fraîches grâce aux conditions réelles auxquelles les feuillets valvulaires sont soumis : contraintes mécaniques en systole et diastole et facteurs sanguins activateurs (lipides, cellules inflammatoires, anticorps, éléments de l'hémostase etc.).

Chapitre 3 – Acide rétinoïque et calcifications valvulaires aortiques

A. Métabolisme et utilisation des rétinoïdes

1. Physiologie et physiopathologie

La voie de l'acide rétinoïque (AR), pourtant majeure dans la valvulogénèse de la voie d'éjection incluant la valve aortique (212–214), a été peu étudiée dans la pathogénie de la

SVA alors que sa stimulation expérimentale chez l'animal a montré des effets bénéfiques dans le cadre de l'athérosclérose (215,216).

L'AR est le métabolite actif du rétinol (ou vitamine A). Il en existe plusieurs isoformes dont le principal est l'**acide tout-trans rétinoïque (ou *all-trans retinoic acid* ou ATRA)** durant l'embryogenèse. L'AR est déterminant dans la formation de plusieurs organes ou systèmes d'organes (système nerveux central, squelette, cœur, yeux, pancréas, poumons et filière génito-urinaire). La production d'AR à partir du rétinol est réalisée en 3 étapes : hydrolyse en *all-trans-retinol* par la rétinyl ester hydrolase (REH), oxydation de l'*all-trans-retinol* en *all-trans-retinal* par la rétinol déshydrogénase (RDH) puis conversion de l'*all-trans-retinal* en ATRA par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). Le rôle de l'AR est la régulation de la transcription via ses récepteurs nucléaires : les récepteurs de l'AR (ou **RAR**) et les récepteurs X rétinoïques (ou RXR), avec des effets directs sur la différenciation, le cycle, la croissance et les réponses cellulaires (**Figure 5**).

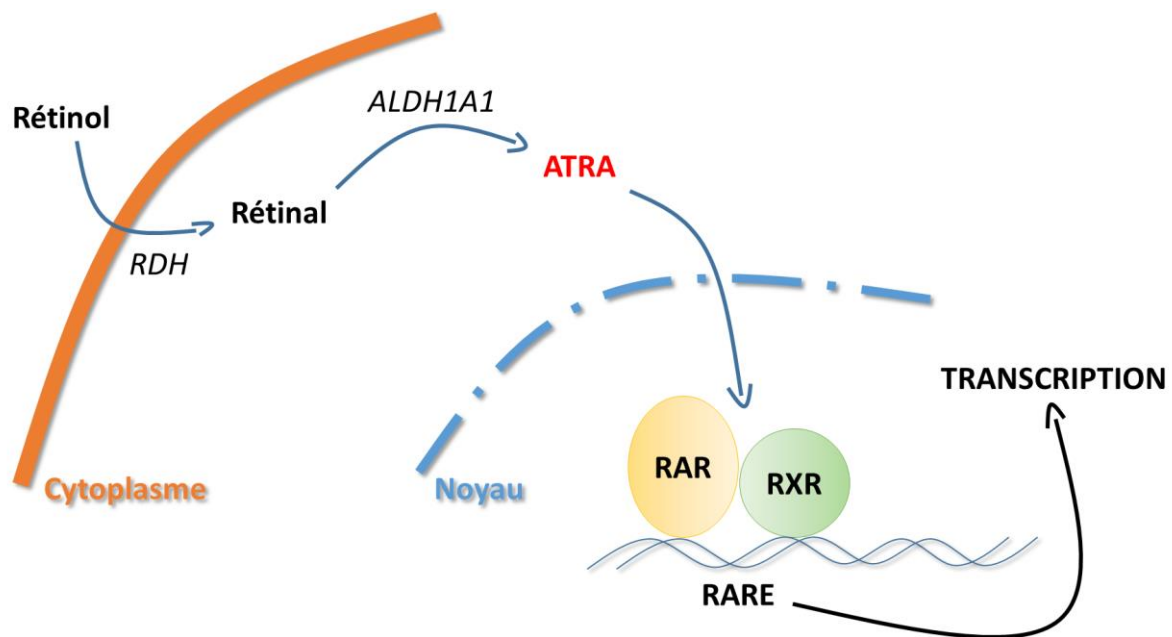


Figure 5. Voie de signalisation (simplifiée) de l'acide rétinoïque. *ALDH1A1* : aldéhyde déshydrogénase 1 A1 ; *ATRA* : acide tout-trans rétinoïque ; *RAR* : récepteur de l'acide rétinoïque ; *RARE* : éléments de réponse à l'acide rétinoïque ; *RDH* : rétinol déshydrogénase ; *RXR* : récepteur X rétinoïque.

In vitro avec divers substrats et *in vivo* chez la souris, la modulation de l'AR cause des effets extra-cardiovasculaires par son action sur des mécanismes physiopathologiques tels que l'angiogenèse, la minéralisation, la différenciation ostéoblastique etc. (**Tableau 1**). Ces mécanismes sont, pour beaucoup d'entre eux, communs à ceux survenant dans le cadre de la pathologie valvulaire aortique calcifiante et participent ainsi au rationnel en faveur de l'étude du rôle de l'AR dans la SVA (cf ci-dessous).

Substrats	Modulateurs	Effets	Mécanismes	Références
Cellules ostéosarcomateuses	Acide rétinoïque	Inhibition	Expression de l'ostéoprotégérine	(217)
Cellules myélomateuses	Tamibarotène (Am80)	Inhibition	Angiogenèse	(218)
Cellules mésenchymateuses	Inhibiteur de RAR (LE135)	Stimulation	Chondrogenèse	(219)
Ostéoblastes	Acide rétinoïque	Inhibition	Minéralisation	(220)
Cellules mésenchymateuses	KO <i>ALDH1A1</i>	Stimulation	Différenciation ostéoblastique	(221)
Souris	KO <i>ALDH1A1</i>	Inhibition	Perte osseuse induite (rosiglitazone)	(222)
Cellules mésenchymateuses	Acide rétinoïque	Inhibition	Différenciation ostéoblastique	(223)

Tableau 1. Récapitulatif des effets extra-cardiovasculaires de la modulation de la voie de l'acide rétinoïque *in vitro* et dans un modèle de souris KO *ALDH1A1*.

Lors du développement cardiaque, des altérations provoquées de la signalisation de l'AR sont à l'origine des malformations congénitales surtout conotruncales (224) : *truncus arteriosus*, communication interventriculaire, tétralogie de Fallot, transposition des gros vaisseaux (225) etc. L'AR semble donc intervenir au niveau des cellules de la crête neurale et du second champ cardiaque pendant l'embryogenèse (214). Le rôle de l'AR est aussi décisif dans la valvulogenèse aortique (226,227) et la composition de la MEC en tissu conjonctif *in vitro* (58).

2. Applications en pratique clinique

A. DERMATOLOGIE

L'ATRA (ou trétinoïne en pharmacologie) est utilisé topiquement pour le traitement de lésions cutanées depuis les années 60 (228,229) et appartient à la famille des **rétinoïdes**. L'indication principale est le traitement topique de l'acné (trétinoïne, isotrétinoïne et adapalène). Le

psoriasis et le sarcome de Kaposi sont également des lésions traitées topiquement par des rétinoïdes : le tazarotène (230) et l'alitrétinoïne (231) respectivement.

Ces dérivés de la vitamine A sont aussi disponibles par voie orale lorsque les lésions cutanées sont plus étendues et/ou plus sévères : isotrétinoïne (acné) (232), alitrétinoïne (eczéma) (233), acitrétine (psoriasis) (234) et bexarotène (lymphome cutané T épidermotrophe, en 2^e intention) (235).

B. HEMATOLOGIE

L'autre spécialité concernée par l'indication des rétinoïdes est l'hématologie, pour une forme particulière de leucémie aiguë myéloïde : la **leucémie aiguë promyélocytaire**, un sous-type de leucémie aiguë myéloïde (LAM, de type 3 selon la classification franco-américano-britannique ou FAB) représentant 10% des LAM (incidence de 1/1 000 000 en Europe). Dans cette pathologie, la différenciation leucocytaire est bloquée au stade de promyélocyte en raison d'une translocation chromosomique t(15;17) provoquant une fusion des gènes RARA (RAR- α , sur le chromosome 17) et PML (leucémie promyélocytaire, sur le chromosome 15). Le traitement par rétinoïde (l'**ATRA/trétinoïne** en l'occurrence) est alors indiqué en première intention ou après rechute après une chimiothérapie ou chez les patients réfractaires aux chimiothérapies. Le mécanisme d'action de l'ATRA dans la leucémie aiguë promyélocytaire consiste en l'induction d'une maturation des promyélocytes en polynucléaires neutrophiles (236,237). Pour le traitement dans le cadre de la leucémie aiguë promyélocytaire, la Haute Autorité de Santé a évalué la population cible en France à 200 par an en 2016 (238).

La molécule sous forme orale est disponible en France depuis son autorisation de mise sur le marché le 16 janvier 1996 sous le nom commercial VESANOID® (CHEPLAPHARM France SAS,

Levallois-Perret, France), avec une dose unique de 10 mg par capsule molle. La trétinoïne fait partie de la classe des Autres antinéoplasiques (groupe ATC – Anatomical Therapeutic Chemical L01XF01 de l'OMS (239)) et sa prescription est réservée aux oncologues et hématologues (Liste I). La dose théorique journalière chez l'enfant et l'adulte est de 45 mg/m² en 2 prises égales (soit environ 4 capsules par prise chez l'adulte) (240). Le traitement (en association avec l'arsenic) est indiqué en urgence à la phase initiale lorsque la leucémie aiguë promyélocytaire est associée à une coagulation intravasculaire disséminée en raison du risque hémorragique (pancytopénie). Le pronostic est favorable par la suite (plus de 95% de rémission complète et environ 90% de survie à 5 ans) (241,242).

La molécule de trétinoïne est absorbée par voie digestive et le pic de concentration plasmatique est atteint en 3 heures, avec une demi-vie moyenne de 0.7 heures et une négativation des dosages 7 à 12 heures après l'administration. Il n'a pas été observé d'accumulation tissulaire de la trétinoïne après administration de doses multiples (240). Néanmoins, la pharmacocinétique de la trétinoïne orale est loin d'être constante. Les taux plasmatiques sont caractérisés par une grande variabilité entre les individus et chez un même patient (243,244).

Les effets indésirables du traitement les plus fréquents sont nombreux : anorexie, état confusionnel, anxiété, dépression, insomnie, céphalée, troubles de la vision, altération de l'audition, arythmie, bouffées vasomotrices, insuffisance respiratoire, sécheresse nasale, asthme, sécheresse buccale, nausées, vomissements, douleur abdominale, diarrhée, constipation, pancréatite, chéilite, érythème, rash, prurit, alopecie, hyperhidrose, douleurs osseuses, douleurs thoraciques, frissons, malaise et augmentations de la triglycéridémie, de la créatininémie, de la cholestérolémie et/ou des transaminases, sans compter les effets

tératogènes en cas de traitement chez la femme enceinte. Pour rappel, les signes d'hypervitaminose A comprennent typiquement les céphalées, les nausées, les vomissements et des symptômes cutanéomuqueux.

B. Modulation de la voie de l'acide rétinoïque dans les calcifications valvulaires aortiques

Des résultats contradictoires mais peu nombreux et de méthodologies hétérogènes ont été publiés quant aux effets de l'AR dans la pathologie valvulaire aortique calcifiante. Une étude a retrouvé une action pro-calcifiante de l'AR via la répression de Sox9 *in vitro* (58), qui s'est confirmée (par la même équipe) *in vivo* dans un modèle animal suivant un régime riche en vitamine A (245). Cette étude a été réalisée sur différentes espèces animales (souris et poussin embryonnaire) dans lesquelles différentes valves (mitrale ou aortique) ont été prélevées. Un traitement à long terme (12 mois) chez la souris a conduit à une sténose modérée de la valve et à une augmentation de l'expression des gènes ostéogéniques dans les homogénats des valves explantées, ce qui a été confirmé dans un système de culture d'explants. Bien qu'intéressantes, ces données doivent être considérées avec prudence car l'effet des rétinoïdes sur la différenciation dépend fortement des espèces, des tissus et des types de cellules et les structures des valves aortique et mitrale, ainsi que les forces hémodynamiques auxquelles elles sont soumises, sont différentes. Il n'est donc sans doute pas judicieux de comparer les sténoses mitrales et aortiques et de supposer que leur physiopathologie est identique.

Au sein de l'unité de recherche, une étude transcriptomique de VIC a été réalisée à partir de valves aortiques calcifiées prélevées au bloc opératoire de chirurgie cardiaque de l'Institut Cœur-Poumon au Centre Hospitalier Universitaire de Lille (France) et de valves aortiques non

calcifiées mais non réimplantables (pour fenestrations ou défaut de compétence valvulaire le plus souvent) obtenues auprès de l'European Homograft Bank (Bruxelles, Belgique). Cette analyse a mis en évidence la dérégulation d'une voie métabolique dans les VIC au cours de la SVA : la principale enzyme de cette voie, l'ALDH1A1 est sous-exprimée dans les VIC pathologiques et dans les zones calcifiées des valves aortiques sténosées (**Figure 6**).

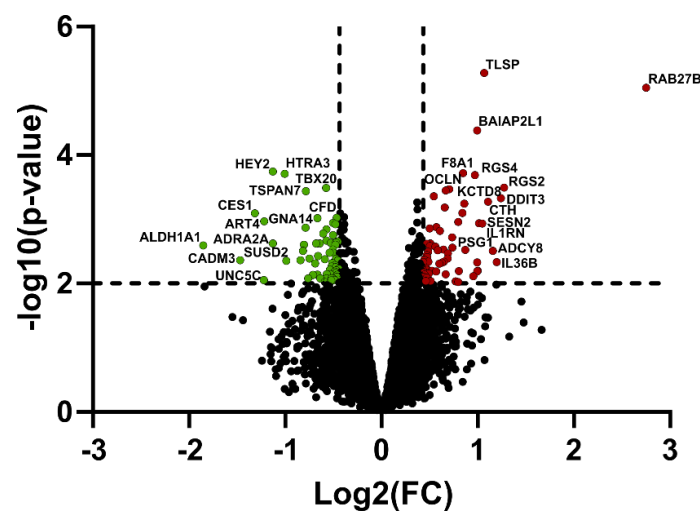


Figure 6. Volcano plot des DEG dans les VIC de valves aortiques calcifiées par rapport aux VIC de valves aortiques non calcifiées. L'ALDH1A1 est le gène le moins exprimé en analyse transcriptomique dans les VIC pathologiques. DEG : differentially expressed genes.

La suite de l'étude (brevets WO 2021/064072, **Annexe 1** et US 2022/0339322, **Annexe 2**) a montré que :

- le niveau d'expression de l'ALDH1A1 est également corrélé avec les critères de sévérité de la SVA,
- l'inhibition de l'expression de l'ALDH1A1 est dépendante de la stimulation par le TGF- β 1,

- l'inhibition de l'expression ou de l'activité de l'ALDH1A1 mène à un profil ostéoblastique dans les VIC et un développement accru de calcifications *in vitro*,
- le traitement des VIC avec de l'AR en condition calcifiante inhibe le profil ostéoblastique des VIC et la formation de calcifications *in vitro*.

Ces résultats sont en phase avec ceux d'une étude récente (246) qui retrouvait *in vitro* une diminution des calcifications dans les VIC humaines cultivées dans un milieu pro-calcifiant en présence d'ATRA. Ces VIC ont aussi été isolées à partir de valves aortiques pathologiques recueillies au bloc opératoire au décours de RVA. A l'inverse, l'inhibition de la signalisation par RAR α avec un siARN favorisait la calcification des VIC en culture. Les résultats de ces auteurs sur les VIC étaient cohérents avec ceux obtenus dans la même étude sur les cellules musculaires lisses vasculaires (aussi vérifiés à l'échelle de la transcription de *RUNX2* qui est diminuée par l'ATRA), confirmant par ailleurs l'implication de la voie de l'AR dans le processus d'athérosclérose.

Chapitre 4 – Objectifs

Ainsi, la SVA est la résultante du dérèglement de nombreux facteurs de risque et de voies de signalisation qui sont inégalement compris et ont été inégalement étudiés. Dans l'état des connaissances actuelles, la prévention primaire de la ScA est une ambition encore irréaliste à ce jour. De même, la prévention secondaire des individus atteints de ScA pour limiter la progression de la maladie vers le stade de SVA n'est pas non plus encore indiquée en raison de l'échec des différents essais cliniques médicamenteux.

En revanche, l'autre enjeu représenté par la défaillance des substituts valvulaires les plus implantés en position aortique, à savoir les bioprothèses, mérite une attention particulière

car la population cible est clairement identifiée et qu'elle est en expansion continue compte tenu de l'augmentation de la prévalence de la SVA.

Les calcifications valvulaires aortiques sur valves natives ou bioprothèses ont fait l'objet de nombreux travaux *in vitro* sur des VIC animales et humaines et *in vivo* chez les petits mammifères. Un défaut dans ce champ de recherche est représenté par la paucité des expérimentations chez les grands mammifères qui permettent aux hypothèses testées de se rapprocher davantage d'une application clinique chez l'homme.

Par conséquent, l'objectif de ce travail est double. Il s'agit tout d'abord de réactualiser et optimiser un modèle ovin de remplacement valvulaire chirurgical précédemment utilisé dans l'unité de recherche à des fins d'ingénierie tissulaire. La sécurisation de ce modèle de SVD chez le grand mammifère doit ensuite permettre d'étudier la modulation d'une voie de signalisation impliquée dans les calcifications valvulaires aortiques et à l'origine de résultats prometteurs *in vitro* dans notre unité de recherche et une autre équipe de référence dans le domaine : la voie de l'acide rétinoïque.

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 1 – Modèle animal : implantation d’une valve aortique porcine chez l’agneau sous circulation extracorporelle

A. Rationnel et autorisation

Le modèle animal choisi pour tester l’hypothèse dérive des précédentes expériences réalisées au sein de l’unité de recherche (106,107). Il s’agissait de tester des pré-traitements de xénogreffes (porcines) valvulaires **pulmonaires** décellularisées implantées sous circulation extracorporelle (CEC) en position orthotopique chez l’agneau. Une SVD était systématique dans les groupes Contrôle (non prétraités), équivalent donc à un modèle accéléré de calcification valvulaire ou de **SVD par réaction immunitaire**.

Pour l’étude présente, le modèle a été modifié pour implanter une xénogreffe (porcine) valvulaire aortique. Le choix du site d’implantation pouvait se discuter entre la position orthotopique (aortique) et une position hétérotopique (en l’occurrence pulmonaire). L’objectif était surtout de soumettre la xénogreffe aux **contraintes hémodynamiques** d’ouverture et fermeture valvulaires et à la **circulation sanguine**. Par ailleurs, comme il l’a précédemment été mentionné, l’implantation d’un substitut valvulaire en position aortique est plus risquée d’un point de vue chirurgical chez l’agneau (247). Par sa position centrale, la valve aortique est plus difficilement exposée que la valve pulmonaire qui est très antérieure (cf ci-dessous). De plus, un clamage aortique avec cardioplégie est nécessaire pour un RVA, avec les complications potentielles qui en découlent (risque hémorragique et altération de la fonction ventriculaire postopératoire par défaut de protection myocardique), en plus du risque de bloc atrio-ventriculaire complet en particulier chez un sujet de petit poids, alors

qu'un remplacement valvulaire pulmonaire est réalisable à cœur battant sans risque de trouble conducteur. Par conséquent, la décision a été prise d'**implanter les xénogreffes aortiques en position pulmonaire** chez les agneaux.

Le protocole d'expérimentation a reçu un avis favorable du comité d'éthique en expérimentation animale n°075 et a été validé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation (Direction générale de la recherche et de l'innovation) (numéro APAFIS#20512-201904291301750). Le bien-être animal était surveillé et garanti par une équipe spécialisée avec encadrement vétérinaire au Département Hospitalo-Universitaire de Recherche et d'Enseignement (DHURE) de la Faculté de médecine de Lille, pôle Recherche (Lille, France).

B. Protocoles d'anesthésie, de chirurgie et de circulation extracorporelle

Une racine aortique porcine (n = 27) était prélevée en conditions aseptiques par sternotomie médiane chez un cochon (poids cible de 20 kg) fraîchement euthanasié. Cette racine aortique, dont l'anatomie est identique à celle de l'homme, contenait la valve aortique, les origines des artères coronaires droite et gauche et une partie du rideau aorto-mitral. Après prélèvement, le diamètre de la jonction ventriculo-artérielle (ou « anneau aortique ») était mesuré à la bougie de Hegar et les artères coronaires étaient ligaturées chacune à leur partie proximale par 2 fils de polypropylène 5/0 (**Figure 7**). La racine était ensuite immédiatement rincée puis conservée au réfrigérateur pendant une durée maximale de 7 jours dans une solution antimicrobienne jusqu'à l'implantation chirurgicale (248) (**Annexe 3**).

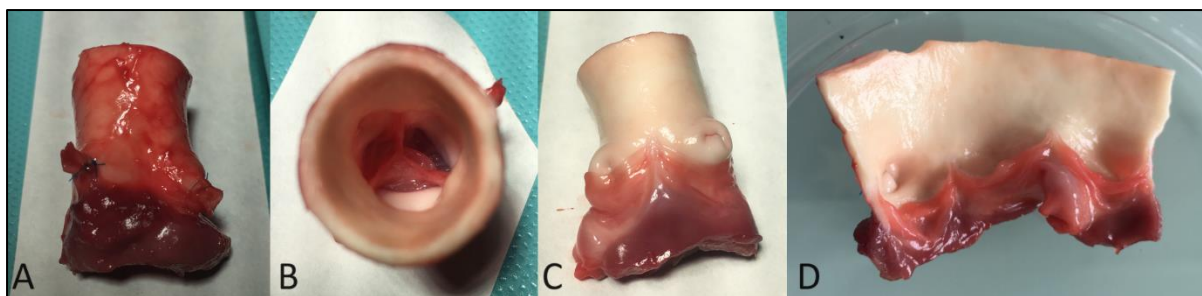


Figure 7. Racine aortique porcine après prélèvement. A : vue latérale gauche après ligature des artères coronaires ; B : vue sur les feuillets coaptés depuis la section distale ; C : vue sur les sinus antéro-gauche et antéro-droit après inversion de la racine ; D : vue interne après section longitudinale au niveau de la commissure gauche-droite. NB : cette racine aortique n'a pas été implantée chez l'agneau.

Les agneaux de race Ile-de-France (poids cible de 20 kg) étaient livrés par l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'environnement (INRAe) Val de Loire – Unité Expérimentale de Physiologie Animale de l'Orfasières (UEPAO) (Nouzilly, France) quelques jours avant l'intervention chirurgicale pour permettre une adaptation des animaux au séjour dans l'animalerie du DHURE. Le protocole d'anesthésie consistait en une prémédication par kétamine en intra-veineux (IV) et xylazine IV, concomitante à une antibioprophylaxie par céfazoline IV avant incision. L'insertion d'une voie veineuse centrale dans la veine jugulaire interne gauche était systématique, de même que la pose d'un capteur de saturation en oxygène sur l'oreille gauche, mais pas l'insertion d'un cathéter artériel dans une artère auriculaire (oreille gauche) pour monitorer la pression artérielle invasive. L'anesthésie générale était assurée par isoflurane inhalé avant démarrage de la CEC, propofol IV pendant la CEC puis isoflurane inhalé après sevrage de la CEC. Une intubation orotrachéale était réalisée, de même que la pose d'une sonde gastrique. L'analgésie et la myorelaxation était réalisées par buprénorphine IV et rocuronium IV respectivement.

En décubitus latéral droit après rasage et désinfection à la chlorhexidine de la paroi thoracique latérale gauche, une thoracotomie dans le 3^e ou 4^e espace intercostal gauche était réalisée chez l'agneau, permettant d'avoir une exposition équivalente à celle d'une sternotomie médiane chez l'homme (**Figure 8**). Après ouverture péricardique longitudinale dans le sens des côtes et suspension péricardique, les 2 bourses artérielles et la bourse veineuse étaient placées respectivement sur l'arche aortique au niveau de la naissance du tronc artériel brachio-céphalique et sur l'auricule droit en même temps que l'héparine (10 kUI) était injectée par la voie veineuse centrale. En raison de l'anatomie artérielle particulière chez l'agneau (tronc supra-aortique unique, à savoir le tronc artériel brachio-céphalique, et aorte ascendante courte (249)), la distalité de la canule artérielle était dirigée vers le tronc artériel brachio-céphalique pour privilégier la perfusion cérébrale pendant la CEC aux dépens de l'hémicorps inférieur.

Après canulation artérielle puis veineuse, la CEC était initiée et maintenue (en normothermie) pour assurer un débit maximal possible (mais de minimum d'1 L/min) sur un circuit Capiox® FX15 3/8 3/8 (Terumo, Tokyo, Japon) et une machine de CEC Sarns Modular Perfusion System 9000 (Terumo, Tokyo, Japon) (pompes à galets). Il faut noter que les équipements pour l'analyse des gaz du sang et de l'ACT (*Activated Clotting Time*) ne sont pas disponibles dans la salle d'intervention du DHURE ni à proximité, de même que la surveillance de l'électrocardiogramme. A cœur battant, le tronc de l'artère pulmonaire était séparé de l'aorte ascendante et clampé juste en amont de la bifurcation. La racine pulmonaire était réséquée (comprenant la valve pulmonaire et le tronc de l'artère pulmonaire et l'anneau pulmonaire natif calibré à la bougie de Hegar. Après rinçage (**Annexe 3**), la racine aortique porcine était implantée en débutant par l'anastomose distale au polypropylène 5/0 suivie de l'anastomose proximale au polypropylène 4/0.

Après vérification de l'hémostase, la CEC était sevrée progressivement et la protamine (6 kUI) administrée (ratio de 0.6:1 avec l'héparine par analogie avec la CEC chez l'homme). Une défibrillation par choc électrique interne était réalisée en cas d'arythmie ventriculaire évidente. Un drain thoracique multi-perforé en aspiration était placé dans la plèvre gauche et le péricarde était refermé partiellement, avant la fermeture de la paroi thoracique (rapprochement des côtes, fermeture des plans musculaire, sous-cutané et cutané).

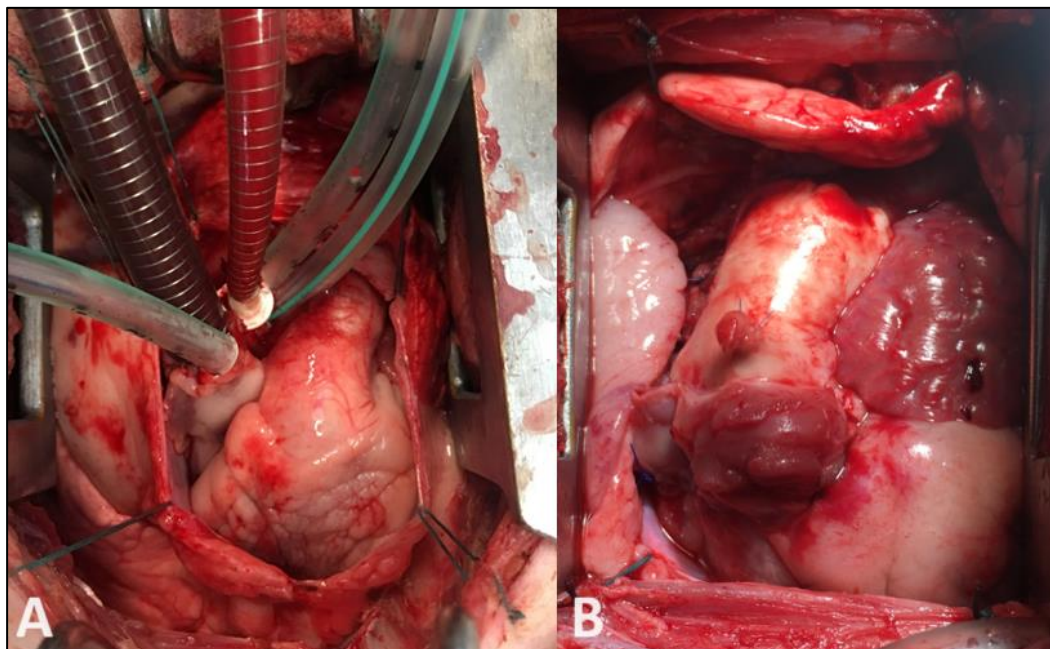


Figure 8. Photographies peropératoires d'un coeur d'agneau (n°16) opéré par thoracotomie latérale gauche dans le 3e espace intercostal. A : sous CEC avant résection de la racine pulmonaire ; B : après implantation de la racine aortique porcine en position pulmonaire et sevrage de la CEC.

L'ablation du drain, le réveil et l'extubation étaient réalisés dans la salle d'intervention dans la première heure suivant la fermeture, et l'alimentation reprise à J1 postopératoire. Une antibiothérapie par amoxicilline intra-musculaire et une anticoagulation préventive par énoxaparine sous-cutanée était maintenue jusqu'à J7 postopératoire.

Les agneaux étaient hébergés pendant 16 semaines au DHURE, avant euthanasie au T-61 pour prélèvement de la xénogreffe aortique. En cas de décès prématuré, une autopsie thoracique était systématiquement réalisée dans les 24 heures pour rechercher ou éliminer une cause hémorragique chirurgicale au décès.

Deux groupes ont été comparés : un groupe Contrôle (implantation d'une xénogreffe aortique) et un groupe traitement par ATRA (implantation d'une xénogreffe aortique et traitement par ATRA pendant 4 mois). La décision d'inclusion dans le groupe ATRA était surtout liée à la disponibilité de la molécule. Trois agneaux ont été exclus de l'analyse en raison d'un sacrifice prématuré lié au premier confinement de la population française durant l'épidémie de SARS-CoV-2 en mars 2020. Une série de 4 agneaux a été opérée pour la caractérisation du modèle : 3 ont reçu une xénogreffe aortique et 1 a été inclus en tant que sham (**Figure 9**).

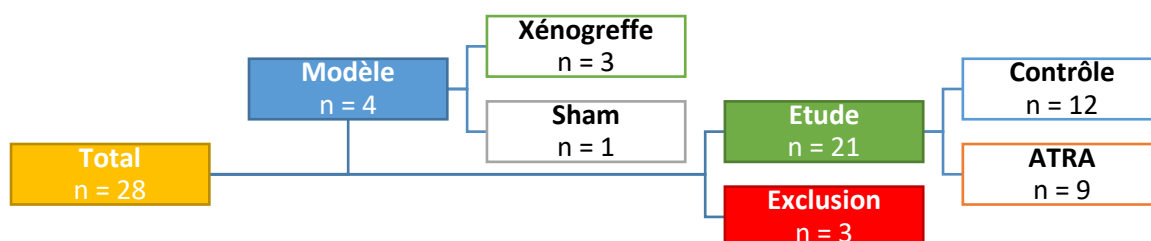


Figure 9. Répartition des agneaux 28 agneaux opérés selon 3 groupes : Etude, Exclusion et Modèle.

Chapitre 2 – Modulation pharmacologique des calcifications valvulaires *in vivo* : all-trans retinoic acid (ATRA) ou trétinoïne

Contrairement aux pharmacocinétiques des vitamines B12, D et E, celle de la vitamine A et ses dérivés n'a quasiment pas été étudiée chez le mouton ou l'agneau (250,251). Les

principaux travaux disponibles portent sur la toxicité de l'hypervitaminose A. Il semble qu'un surdosage de la vitamine A soit très bien toléré chez l'agneau de 11 mois (29 kg) (252) mais pas en période néonatale chez l'agneau encore nourri au lait (253).

Le rétinoïde choisi pour tester l'hypothèse selon laquelle une stimulation de la voie de l'acide rétinoïque permet de diminuer les calcifications valvulaires aortiques est l'**ATRA** ou trétinoïne (VESANOID) dont les caractéristiques ont été détaillées précédemment.

Compte tenu du gabarit pédiatrique des agneaux (poids médian de 23 kg, **Tableau 1**), la dose journalière totale a été fixée à **20 mg**. Les agneaux du groupe ATRA ont été traités de manière biquotidienne dès le lendemain de l'intervention chirurgicale, tous les jours (y compris les week-ends et jours fériés) pendant 4 mois, à la dose de 10 mg par prise. Une capsule molle était administrée par voie orale en introduisant un tube jusque dans le pharynx de l'animal et en s'assurant de sa prise effective à l'issue de la manipulation par inspection de la cavité buccale, chez des spécimens le plus souvent assez coopérants.

Chapitre 3 – Méthodes d'évaluation

A. Echocardiographie transthoracique

Les échocardiographies transthoraciques ont été réalisées sous anesthésie générale (isoflurane inhalée) après prémédication par xylazine, par un opérateur expérimenté unique (spécialiste en Cardiologie) en aveugle. Les examens étaient réalisés très précocement (avant la fin des 2 semaines postopératoires), à 1 mois, 2 mois et 4 mois postopératoires chez tous les agneaux encore vivants aux différentes échéances.

Les études échocardiographiques ont été réalisées avec un échographe ACUSON Sequoia™ (Siemens Healthineers, Erlangen, BY, Allemagne) muni d'une sonde ACUSON 3V2c (Siemens Healthineers). Contrairement à ce que d'autres auteurs ont préconisé (190), une résection partielle d'une ou plusieurs côtes n'a pas été nécessaire pour l'obtention de fenêtres satisfaisantes. Les paramètres mesurés étaient les suivants : Vmax (m/s) et gradient moyen (mmHg) à travers la xénogreffe aortique et diamètre de la jonction ventriculo-aortique de la xénogreffe (mm). Les autres paramètres étudiés mais non quantifiés étaient : la calcification de la xénogreffe aortique, la fuite au sein de la xénogreffe, l'épanchement péricardique et la fonction biventriculaire visuelle.

B. Analyses macroscopiques et histologiques

Après explantation, les xénogreffes aortiques étaient inspectées macroscopiquement à la recherche de calcifications. La recherche macroscopique d'infection (endocardite) était réalisée de principe et a toujours été négative.

Compte tenu de l'analogie existante entre la xénogreffe aortique implantée chez l'agneau et un modèle particulier de bioprothèse implantée en pratique clinique chez l'homme (Freestyle™ Aortic Root, Medtronic) qui est essentiellement constituée d'une racine aortique porcine valvée sans armature, l'analyse des calcifications en histologie s'est focalisée sur la **paroi artérielle** de la xénogreffe plutôt que sur les feuillets valvulaires eux-mêmes. En effet, il a été clairement démontré que les bioprothèses porcines dégénéraient sous la forme d'une calcification prédominante de la paroi artérielle par rapport aux feuillets à moyen/long terme chez l'homme (254,255).

Les tissus étaient rincés au phosphate-buffered saline (PBS) stérile 1X puis fixés dans la paraformaldéhyde à 4% (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) et inclus dans la paraffine avant d'être congelés. Des sections de 5 µm sur blocs congelés ont été réalisées. Les sections étaient colorées pendant 2 minutes au **rouge alizarine** 1% (Sigma-Aldrich). La surface de coloration au rouge alizarine était calculée par le logiciel ImageJ 1.53 (imagej.net) et exprimée en pourcentage de la surface colorée de la pièce histologique.

C. Analyses protéiques : Western blot

Pour préserver la cohérence des analyses avec celle de l'étude histologique, l'étude de l'expression protéique s'est également focalisée sur les tissus de la **paroi artérielle** des xénogreffes.

La première étape de l'**extraction protéique** des tissus précédemment congelés a consisté à réaliser une lyse cellulaire dans le tampon de lyse RIPA (*radioimmunoprecipitation assay buffer* : désoxycholate de sodium 0.025%, Tris 50 mM, NaCl 150 mM, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1 mM et Igepal CA630 à 0,01%) 5 mL) supplémenté de : phénylméthylsulfonyl fluoride/PMSF 50 µL à 0.1 M (1mM), inhibiteur de protéase/PI 10X 500 µL (1X), fluoride de sodium/NaF 50 µL à 1 M (10 mM) et orthovanadate de sodium/Na₃VO₄ à 0.1 M (1mM). Les échantillons de paroi artérielle étaient broyés avec le RIPA (200 µL/échantillon tissulaire) puis centrifugés pendant 10 minutes à 4°C et 16 000 G.

Les suspensions étaient récupérées et les concentrations mesurées (kit BCA protein assay, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) et étalonnées par rapport au BSA (*bovine serum albumin*, 2 mg/mL dilué en cascade) dans un plateau qui était ensuite incubé dans une étuve à 37°C pendant 30 minutes. L'absorbance était mesurée au spectrophotomètre Infinite® 200

Pro (Tecan, Männedorf, Suisse). La mise en conditions réductrices et dénaturantes était ensuite réalisée dans des aliquots contenant 40 μ L solution composée de : 10 μ L de dodécylsulfate de sodium (LDS) 4X, 4 μ L de dithiothréitol (DTT) 10X, du volume d'échantillon adapté à la concentration pour 20 μ g et du volume d'eau distillée pour compléter les 40 μ L. Les échantillons étaient chauffés à 95°C pendant 10 minutes, puis conservés à -20°C pendant la 1^{re} nuit.

La **migration par électrophorèse** était réalisée sur gel de polyacrylamide 4-12% placé dans une cuve remplie tampon de migration (380 mL d'eau et tampon 20X (Novex MES SDS running buffer, Thermo Fisher Scientific). Le marqueur de poids moléculaire (10 μ L, Novex sharp pre-stained, Thermo Fisher Scientific) était placé dans le 1^{er} puits, adjacents aux dépôts des échantillons réduits et dénaturés. La migration était réalisée à 80 V pendant 40 minutes puis 120 V pendant 40 minutes, et la plaque contenant le gel était retirée. Le gel était immergé dans de l'éthanol à 20% avant le transfert sur membrane de polyfluorure de vinylidène (PDVF) (kit iBlot PVDF, Thermo Fisher Scientific) à 20 V pendant 7 minutes (Invitrogen™ iBlot™ 2 Gel Transfer Device, Thermo Fisher Scientific). La membrane était récupérée et recoupée selon les bandes de poids moléculaires voulus.

Un contrôle par rouge Ponceau S permettait la révélation de la présence de protéines, avant 3 rinçages de 10 minutes par du TBST 0.1% (Tris-Buffered Saline 1X + Tween® 0.1%, Sigma-Aldrich). Un blocage de la membrane pour la saturation des sites de fixation était ensuite réalisé par trempage dans une solution hautement protéique (BSA + TBST 5%) pendant 1 heure sur une plaque à agitation lente. Les **anticorps primaires** dilués au 1000^e était ajoutés, avant conservation en agitation lente à 4°C pendant la 2^e nuit. Ces anticorps primaires étaient les suivants : **ALDH1A1** (IgG souris, 54 kDa, AM1846b, Abcepta, San diego, CA, USA), **Runx2**

(IgG lapin, 55-62 kDa, D1H7, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA) et **β-actine** (IgG lapin, 45 kDa, D6A8, Cell signaling Technology).

La **révélation** était réalisée en plusieurs étapes : récupération des anticorps primaires, rinçage de la membrane 3 fois pendant 5 minutes dans du TBST 0.1%, ajout de l'anticorps secondaire (anti-souris pour ALDH1A1, anti-lapin pour Runx2 et β-actine) dilué au 10000^e (1 µL dans 10 mL de BSA + TBST 5%) au contact avec la membrane pendant 1 heure, rinçage de la membrane 3 fois pendant 5 minutes dans du TBST 0.1%, réaction enzymatique Horse Radish Peroxidase/HRP avec le kit Thermo Scientific™ Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific) : Detection Reagent 1 (peroxide solution) 2 mL + Detection Reagent 2 (luminol enhancer solution) 2 mL et lecture (Invitrogen™ iBright™ CL1500, Thermo Fisher Scientific).

Le signal sur la membrane était analysé par le logiciel ImageJ 1.53 (imagej.net) et l'intensité du signal des protéines d'intérêt pour un échantillon était exprimée par rapport à l'intensité de la β-actine pour le même échantillon.

D. Analyses génétiques : RT-qPCR

La transcription des gènes d'intérêt a été étudiée sur les tissus de la **paroi artérielle** des xénogreffes porcines, comme pour les analyses histologiques et protéiques.

Les tissus étaient lysés au TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) (500 µL/aliquot) pour permettre l'extraction de l'ARN (256) en utilisant le Direct-zol RNA Microprep kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Ensuite, 2 µg d'ARN extrait subissaient une transcription inverse avec le High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) dans un volume total de

20 µL. Les échantillons étaient incubés à 25°C pendant 10 minutes, puis 37°C pendant 2 heures et 85°C pendant 5 minutes. La RT-qPCR (quantitative real-time polymerase chain reaction) était réalisée avec l'ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific).

Quatre microlitres d'ADNc étaient ajoutés à 16 µL d'un mélange contenant : 10 µL d'une solution contenant la Taq polymérase, MgCl₂ et dNTPs (Thermo Fisher Scientific), 1 µL de la solution contenant la sonde TaqMan spécifique pour le gène d'intérêt, les amorces sens et anti-sens, et 5 µL d'eau. Les amorces des gènes d'intérêt étaient utilisées avec les sondes TaqMan™ (TaqMan™ Gene Expression Assay, Thermo Fisher Scientific) : **Abelson/ABL** (Hs01104728_m1, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), **ALDH1A1** (Hs00946916_m1, Applied Biosystems), **phosphatase alcaline/ALPL** (Hs01029144_m, Applied Biosystems) et **RUNX2** (Hs00231692_m1, Applied Biosystems). L'expression des différents gènes d'intérêt devait être rapportée à celle du gène de ménage Abelson/ABL et la quantification des transcrits devaient être réalisée avec la méthode comparative utilisant le *cycle threshold* (Ct) et calculées avec la formule $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

En raison de valeurs aberrantes du gène de ménage ABL dans tous les échantillons de paroi artérielle de xélogreffe aortique, la quantification de la transcription des gènes d'intérêts n'a finalement pas été réalisée.

E. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, NY, USA). Les résultats sont présentés sous forme de médiane (écart interquartile) pour les variables continues. Les tests de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour

rechercher une différence au niveau d'une variable continue entre 2 ou 3 groupes respectivement. Le test de χ^2 ou le test exact de Fischer a été utilisé pour rechercher une différence au niveau d'une variable catégorielle entre 2 ou 3 groupes. La différence a été considérée comme significative pour une valeur de $p < 0.05$.

RESULTATS

Chapitre 1 – Fragilité du modèle animal utilisé

A. Description de la cohorte

Entre juillet 2019 et août 2021, un total de 28 agneaux a été opéré, qui peuvent être classés dans 3 groupes : Etude (n = 21, cf. Chapitre 3), Exclusion (n = 3) et Modèle (n = 4) (**Figure 9**).

Les caractéristiques morphologiques, les données de circulation extracorporelle et les données postopératoires sont détaillées dans le **Tableau 2**. Dans la cohorte globale, le poids médian des agneaux opérés était de 23 kg (21.7 – 25.0), le diamètre médian de l’anneau pulmonaire de 14 mm (14 – 15) et le diamètre médian de la racine aortique porcine implantée de 14 mm (14 – 15). La durée médiane et le débit médian de CEC étaient de 60 minutes (53.5 – 67) et 1.20 L/min (1.03 – 1.30) respectivement. La survie médiane était de 63.5 jours (2.75 – 117.7), le taux de décès précoce de 32.1% (n = 9) et le taux de décès tardif de 14.3% (n = 4).

Les 21 agneaux du **groupe Etude** (n°1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24) constituent le cœur des travaux centrés sur la modulation des calcifications par les rétinoïdes et ont été répartis en 2 sous-groupes : Contrôle (n = 12) et ATRA (ou trétinoïne) (n = 9) (cf Chapitre 3).

Les 3 agneaux du **groupe Exclusion** (n°13, 14 et 15) ont été exclus a posteriori de l’étude Contrôle vs ATRA en raison d’une euthanasie contrainte par le premier confinement en mars 2020 causé par la pandémie de SARS-CoV-2.

Les 4 agneaux du **groupe Modèle** ont été opérés en fin d’expérience pour étudier le processus de calcification de la xénogreffe aortique à des temps intermédiaires (n°25, 26 et 27). La cible de la fin de l’expérimentation était d’1 mois (n°25), 2 mois (n°26) et 4 mois (n°27). A l’échelle

	Total n = 28	Etude n = 21	Exclusion n = 3	Modèle n = 4	p
Poids des cochons (kg)	21 (19.4 – 24)	22 (20.1 – 24.4)	23 (19 – /)	21 (19 – /)	0.75
Diamètre VA porcine (mm)	14 (14 – 15)	14.5 (14 – 15)	14 (14 – /)	14 (14 – 14)	0.36
Poids des agneaux (kg)	23 (21.7 – 25.0)	22.5 (19.7 – 24)	25 (21.5 – /)	24.5 (24 – 25 .7)	0.12
Diamètre AP ovin (mm)	14 (14 – 15)	14 (14 – 14)	14 (14 – /)	15 (15 – 15)	0.04
Délai d'implantation (jours)	3 (2 – 6)	3 (1 – 5)	3 (2 – /)	7 (6 – /)	0.08
Durée de CEC (min)	60 (53.5 – 67)	60.5 (52 – 71.2)	60 (55 – /)	56.5 (50.7 – 60)	0.63
Débit moyen de CEC (L/min)	1.20 (1.03 – 1.30)	1.20 (1.10 – 1.35)	1.2 (1.2 – /)	1.0 (1.0 – 1.38)	0.36
Durée de survie (jours)	63.5 (2.75 – 117.7)	111 (1 – 117.5)	35 (32 – /)	95 (46.7 – 125.2)	0.31
Décès précoce (≤ 30 jours)	9 (32.1%)	9 (42.9%)	0 (0%)	0 (0%)	0.15
Décès tardif (> 30 jours)	4 (14.3%)	1 (5%)	3 (100%)	0 (0%)	0.003

Tableau 2. Caractéristiques morphologiques, données de circulation extracorporelle et données postopératoires de la cohorte totale.

macroscopique et protéique (Runx2), la présence de calcifications au niveau de la paroi artérielle est déjà constatée à 1 mois, et il semble que les niveaux de calcifications à 2 et 4 mois soient comparables (**Figure 10**). Le dernier agneau de la cohorte (n°28) a servi de **sham** : suivant le même protocole d'anesthésie et d'abord chirurgical, une circulation extracorporelle a été réalisée entre l'oreillette droite et l'arche aortique pendant 60 minutes. La valve pulmonaire a été inspectée à travers une artériotomie pulmonaire transversale qui a été refermée avec un surjet de polypropylène 5/0. La racine et la valve pulmonaires natives ont été inspectées après sacrifice suivant un séjour de 4 mois à l'animalerie : aucune calcification n'était constatée au niveau valvulaire ni artériel, ni à l'échelle macroscopique (**Figure 11**) ni

en analyse protéique (**Figure 10**), confirmant l'absence d'effet délétère (notamment pro-calcifiant) de la CEC sur les valves chez l'agneau.

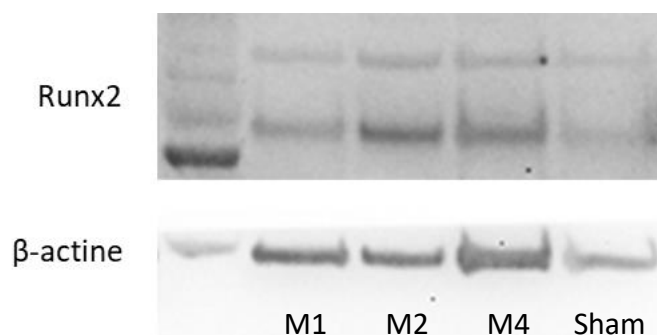


Figure 10. Western blot Runx2 et β -actine dans les valves en position pulmonaire chez les agneaux du groupe Modèle. Une surexpression de Runx2 est constatée à 1 mois (M1, n°25), plus marquée à 2 mois (M2, n°26) et 4 mois (M4, n°27) postopératoires dans les xénogreffes aortiques porcines, alors que l'expression à 4 mois est très faible dans la valve chez l'agneau sham (n°28).



Figure 11. Photographies de la racine aortique porcine et de la racine pulmonaire native explantées à 4 mois postopératoire chez les agneaux 27 (gauche) et 28 (droite, sham) respectivement. Les différences entre les 2 pièces opératoires sont notées au niveau de la calcification, de la rigidité de la paroi artérielle et des feuillets et de la contraction de la jonction ventriculo-aortique.

B. Mortalité

Neuf décès précoces (32.1% de la cohorte totale) et 4 décès tardifs (14.3% de la cohorte totale) sont survenus, soit un total de **13 décès (46.4%) inattendus**.

Les **décès précoces** sont survenus le plus souvent le jour même (J0) ou le lendemain (J1) de l'intervention (n = 6/9 soit 66.7%). Les causes de décès précoces étaient : hémorragie (n = 3), iatrogénie (n = 2), arythmie présumée (n = 2), insuffisance respiratoire par distension gastrique (n = 1) et bas débit cérébral (n = 1). Un seul décès sur table est survenu avant fermeture cutanée, par plaie aortique majeure lors de la tentative de canulation artérielle (n°10). Toutes les autres interventions ont pu être menées à terme. Deux agneaux (n°5 à J5 et n°11 à J25) sont décédés suite à l'anesthésie générale induite pour la réalisation de l'échocardiographie transthoracique et la cause de leur décès a donc été étiquetée comme étant iatrogénique.

Le **décès tardif** est défini par la survenue d'un décès entre le 31^e jour postopératoire inclus et avant la fin programmée de l'expérimentation chez l'animal en question. Parmi les 4 décès tardifs, 3 ont consisté en une euthanasie contrainte par le début du premier confinement en raison de la pandémie de SARS-CoV-2 en mars 2020. Le seul décès tardif réel (n°19 à J60) est directement lié à l'anesthésie générale ayant permis la réalisation de l'échocardiographie transthoracique de routine au 2^e mois postopératoire (iatrogénie). Pour 2 des sujets du groupe Modèle (n°25 et 26), les décès sont survenus avant 4 mois (à J40 et J67) respectivement, mais les sacrifices avaient été programmés à ces termes.

Même si les 3 agneaux du groupe Exclusion n'étaient pas pris en compte pour le calcul du nombre de décès, le taux de mortalité avant le terme de l'expérimentation (10/25 soit 40%) resterait très élevé. Le modèle de remplacement valvulaire pulmonaire avec une xénogreffe aortique chez l'agneau de petit poids est donc un modèle exploitable mais très fragile.

Chapitre 2 – Modifications apportées au modèle animal et leurs effets

Compte tenu des pertes très élevées en début d'expérience, une réflexion a été initiée rapidement pour améliorer la viabilité du modèle dont la fragilité mettait en péril la pérennité du protocole. La première phase des travaux a donc essentiellement consisté à optimiser la technique chirurgicale, la gestion de la circulation extracorporelle et la gestion des sédations postopératoires pour la réalisation des échocardiographies.

A. Mesures invasives

1. Canulation veineuse

En dehors de l'accident de canulation artérielle mentionnée précédemment (n°10), il n'y a pas eu de problème technique relevé au niveau artériel. En revanche, la canulation veineuse a été problématique en début d'expérience. Il s'agissait de trouver un équilibre entre un drainage veineux suffisant (canule la plus large possible) pour faciliter l'implantation de la xénogreffe (en particulier l'anastomose proximale) et l'absence de désamorçage ou de déchirure de l'oreillette droite (canule la moins large possible). En raison d'un désamorçage fréquent et de la survenue de quelques déchirures atriales droites après retrait de la canule, le diamètre des canules veineuses a progressivement diminué de 30-34 Fr à 26 Fr quel que soit le poids de l'agneau. Un des décès très précoces (n°1) est sans doute imputable à un bas débit cérébral en raison de désamorçages trop fréquents de la CEC.

2. Optimisation de la ventilation par drainage gastrique

Un agneau (n°8) est décédé d'insuffisance ventilatoire aiguë par compression thoracique causée par une distension gastrique (**Figure 12**). Une autopsie abdominale a été réalisée qui a retrouvé l'extrémité de la sonde gastrique dans le 3^e estomac alors que le rumen (1^{er} estomac) n'était pas drainé. La pratique a donc été modifiée pour avancer la sonde gastrique le plus loin possible, et en cas de distension gastrique peropératoire, il a été convenu de réaliser de manière radicale une ponction transcutanée de l'estomac pour relâcher la distension.

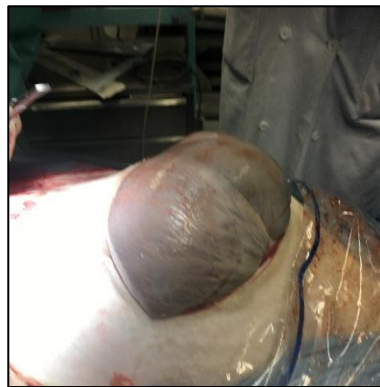


Figure 12. Photographie post-mortem de l'extériorisation du rumen de l'agneau n°8 par distension aérienne, après laparotomie.

B. Mesures médicales

1. Mesures peropératoires : conduite de la circulation extracorporelle

Le *priming* de la CEC était initialement réalisé au sérum physiologique (chlorure de sodium NaCl 0.9%) sans supplémentation ionique. Il faut rappeler que l'équipement de surveillance per-CEC est suboptimal au DHURE (cf. Matériels et Méthodes), ce qui a complexifié la gestion de la CEC. Quatre décès précoces sont directement imputables à un problème lié à la CEC : 2

chocs hémorragiques (de causes non chirurgicales) et 2 arythmies (certainement par dyskaliémie).

Après discussion avec un médecin anesthésiste-réanimateur de l'Institut Cœur-Poumon du Centre Hospitalier Universitaire de Lille, des modifications ont été apportées à la gestion de la CEC pour garantir le maximum de sécurité dans des conditions dégradées : *priming* au Ringer Lactate en remplacement du sérum physiologique, ajout de chlorure de potassium KCl dans le priming (1 g/L de priming) avant le démarrage de la CEC (intérêt dans la prévention de l'arythmie) et ajout de chlorure de calcium CaCl_2 (1 g) dans le circuit de CEC avant le début du sevrage (intérêt pour la fonction cardiaque et l'hémostase). Enfin, des bolus d'adrénaline (1 mg) étaient administrés après sevrage de la CEC lorsque cela était nécessaire (bradycardie extrême).

Au niveau de l'hémostase, la dose de protamine a été augmentée pour atteindre un ratio 1:1 avec la dose d'héparine avec l'idée d'optimiser l'hémostase post-CEC en l'absence de surveillance de l'ACT.

2. Mesures postopératoires

Deux décès précoces sont survenus dans les suites immédiates d'une anesthésie générale induite pour la réalisation d'une échocardiographie de référence. Le premier agneau décédé dans ces conditions (n°5 à J5) nous a incité à décaler la réalisation de l'échocardiographie de référence à la 2^e semaine postopératoire en raison d'une fragilité supposée durant la 1^{re} semaine postopératoire. Ce délai supplémentaire a possiblement empêché la survenue d'autres décès liés à la sédation, mais pas ceux des agneaux n°11 (à J25) et n°19 (à J60).

De plus, lorsque cela était possible d'un point de vue organisationnel (en l'occurrence pour les agneaux n°9, 24 et 28), les échocardiographies de référence postopératoires ont été calées immédiatement après la fin de l'intervention chirurgicale en prolongeant la sédation par isoflurane inhalé pour éviter l'exposition précoce aux risques d'une sédation postopératoire.

C. Effets des modifications du protocole

L'ensemble des mesures suscitées a visé à limiter les risques de bas débit cérébral, d'arythmie, d'hémorragie et à améliorer les fonctions cardiaque et respiratoire.

En scindant la cohorte en 2 parties égales selon la période de l'expérience (première période avec les 14 premiers agneaux opérés et seconde période avec les 14 derniers agneaux opérés), une différence du taux de mortalité précoce est dégagée qui est significative ($p = 0.043$) : 7/14 (50%) pour la première période vs 2/14 (14%) pour la seconde période (**Figure 13**).

Par ailleurs, aucun décès n'a été enregistré chez les 12 derniers agneaux opérés et ce de manière consécutive.

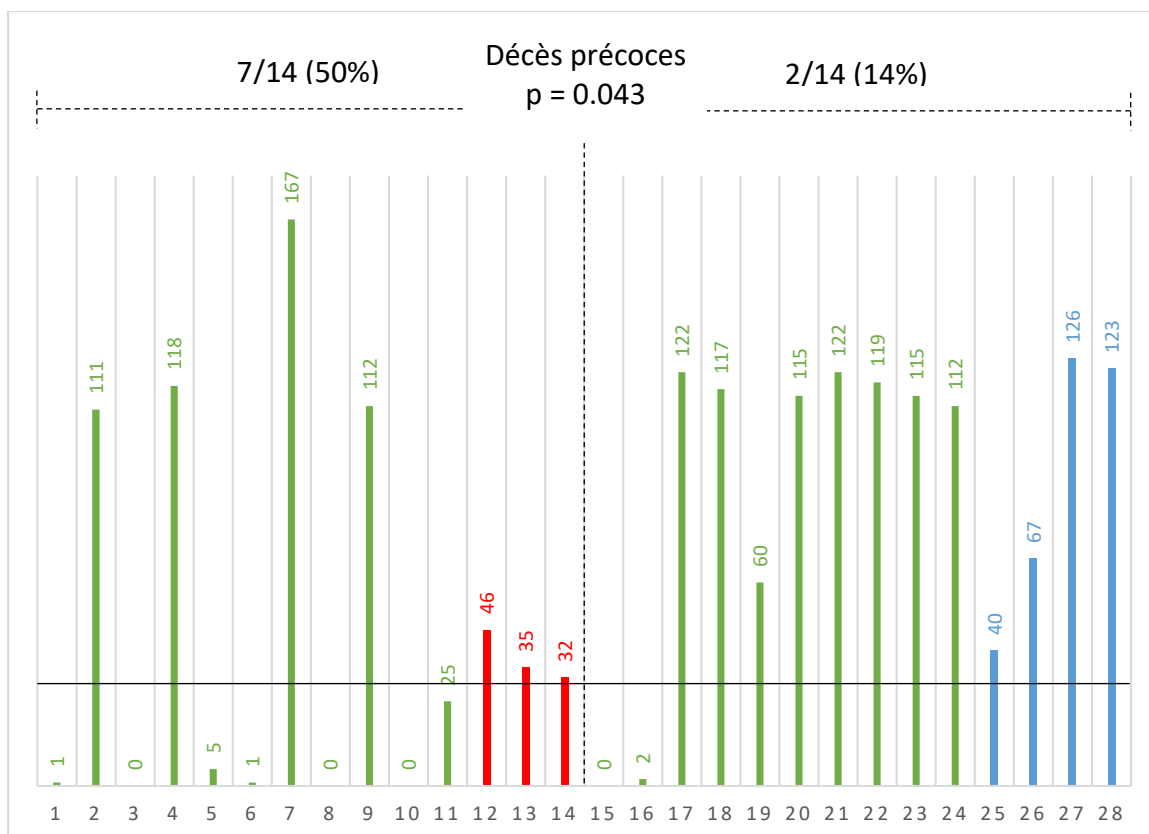


Figure 13. Survie des 28 agneaux opérés (en jours postopératoires).

Les sujets ont été classés par ordre chronologique selon la date d'intervention chirurgicale. En vert, les sujets qui ont été inclus dans l'étude ; en rouge, les sujets qui ont été exclus de l'étude ; en bleu, les sujets qui ont été utilisés pour la caractérisation du modèle. La ligne horizontale noire pleine représente la limite des 30 jours en dessous de laquelle la mortalité est considérée comme précoce. La ligne verticale noire pointillée scinde la cohorte en une première période (n°1 à 14) et une seconde période (n°15 à 28). L'analyse statistique retrouve une différence significative entre les taux de mortalité de la première période (50%) et de la seconde période (14%).

Chapitre 3 – Effets de l'acide rétinoïque sur les calcifications valvulaires *in vivo*

A. Description du groupe Etude

La distribution et la survie des 21 agneaux opérés dans le groupe Etude sont décrites dans la **Figure 14** et la **Figure 15** respectivement. Douze agneaux ont été inclus dans le sous-groupe Contrôle et 9 dans le sous-groupe ATRA. Les caractéristiques de ces agneaux sont résumées

dans le **Tableau 3** : aucune différence significative pré, per et postopératoire n'était notée entre les 2 sous-groupes.

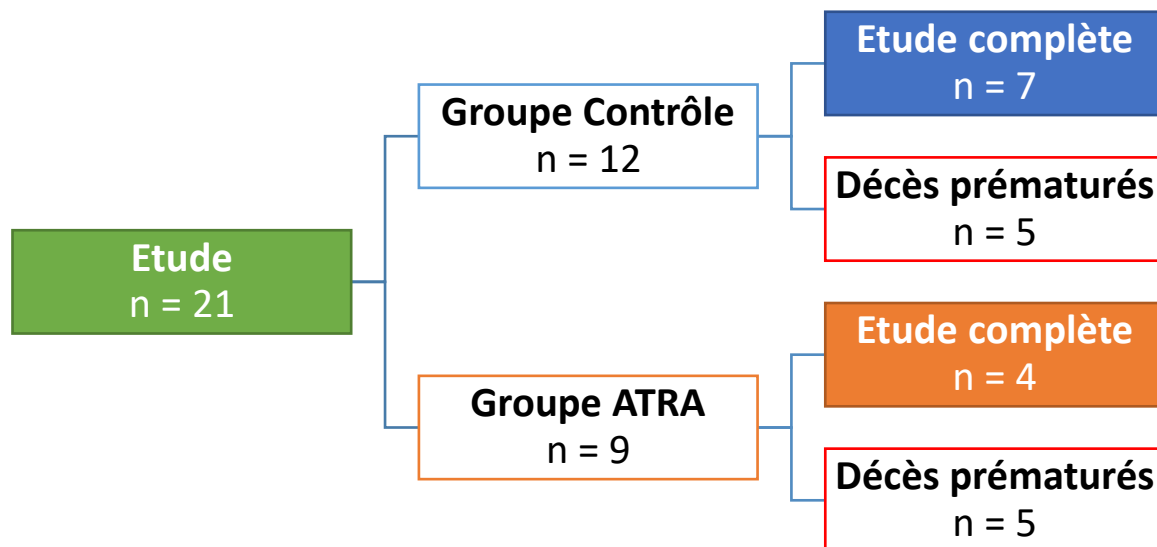


Figure 14. Répartition des 21 agneaux opérés dans le groupe Etude. *Etude complète signifie que l'agneau a survécu jusqu'au terme des 4 mois d'expérimentation. Décès prématurés inclus les décès précoces et les décès tardifs.*

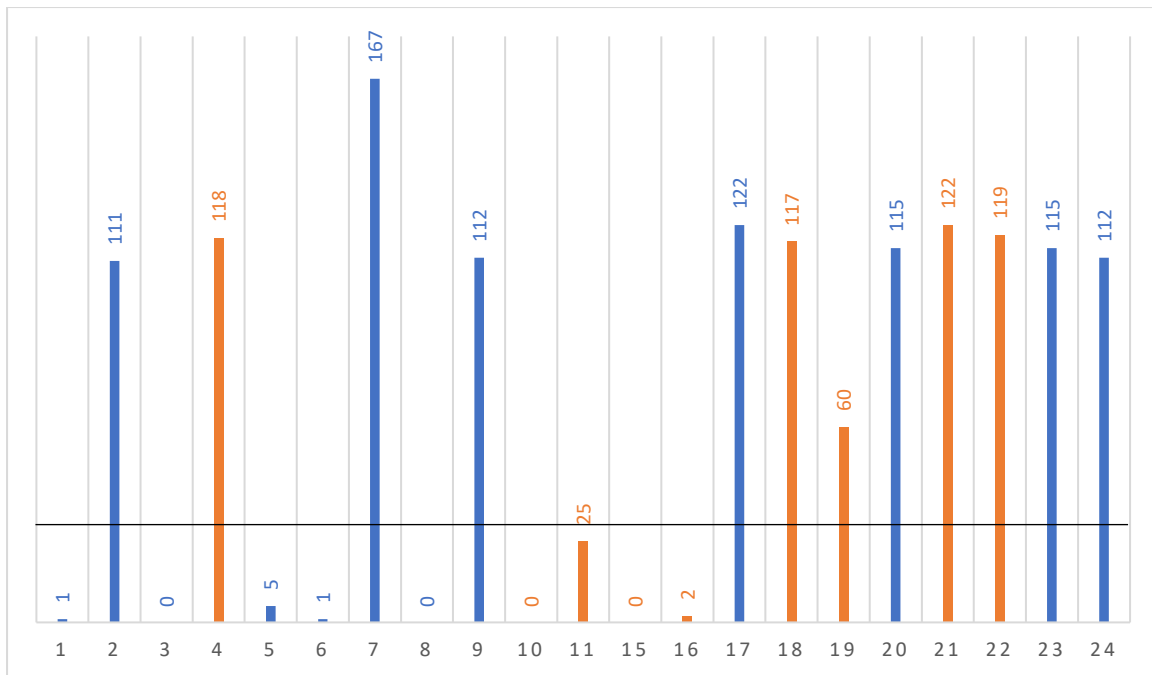


Figure 15. Survie des 21 agneaux opérés dans l'Etude (en jours postopératoires).

Les sujets ont été classés par ordre chronologique selon la date d'intervention chirurgicale. En bleu, les sujets qui ont été inclus dans le sous-groupe Contrôle (n = 12) ; en orange, les sujet qui ont été inclus dans le sous-groupe ATRA (n = 9). La ligne horizontale noire pleine représente la limite des 30 jours en dessous de laquelle la mortalité est considérée comme précoce.

	Etude n = 21	Groupe Contrôle n = 12	Groupe Trétinoïne n = 9	p
Poids des cochons (kg)	21 (19.6 – 24)	20.5 (19.2– 23.2)	24 (21 – 25)	0.21
Diamètre des valves aortiques porcines (mm)	14.5 (14 – 15)	14 (14 – 15)	15 (14 – 15)	0.60
Poids des agneaux (kg)	22.5 (19.7 – 24)	22.5 (19.5 – 24.9)	22.7 (19.7 – 23.7)	0.96
Diamètre des anneaux pulmonaires ovins (mm)	14 (14 – 14)	14 (14 – 14)	14 (13.2 – 15)	0.60
Délai d'implantation (jours)	3 (1 – 5)	3.5 (1 – 5)	2 (1.5 – 5.5)	0.97
Durée de CEC (min)	60.5 (52 – 71.2)	60.5 (45.7 – 73.7)	61.5 (55 – 73)	0.90
Débit moyen de CEC (L/min)	1.20 (1.10 – 1.35)	1.2 (1.1 – 1.3)	1.2 (1.0 – 1.6)	0.84
Durée de survie (jours)	111 (1 – 117.5)	111.5 (1 – 115)	60 (1 – 118.5)	0.86
Décès précoce (≤ 30 jours)	9 (42.9%)	5 (41.7%)	4 (44.4%)	1.0
Décès tardif (> 30 jours)	1 (5%)	0 (0%)	1 (11.1%)	0.67

Tableau 3. Caractéristiques morphologiques, données de circulation extracorporelle et données postopératoires des 21 agneaux de l'Etude.

Pour l'anecdote, on signalera que 2 des 3 agneaux du groupe Exclusion sacrifiés en raison du confinement provoqué par la pandémie de SARS-CoV-2 avaient débuté un traitement par ATRA.

Enfin, un des agneaux du sous-groupe Contrôle (n°7) a été surveillé à l'animalerie au-delà de la période prévue des 4 mois, pendant 167 jours, pour tester les limites du modèle. A 6 mois et malgré une calcification spectaculaire de la xénogreffe aortique avec réduction sévère du diamètre valvulaire, le bien-être de l'animal était préservé.

B. Modulation des calcifications valvulaires dans le modèle animal

1. Echocardiographie transthoracique

Sans causer de sténose valvulaire significative, une **progression de la Vmax** modérée (de 0.6 m/s) mais significative est retrouvée dans le groupe Contrôle entre l'examen du 1^{er} mois et du 4^e mois postopératoire. Cette évolution est plus importante ($p = 0.033$) dans le sous-groupe Contrôle que dans le sous-groupe ATRA dans lequel la progression de la Vmax était de 0.2 m/s entre le début et la fin de l'expérience (**Figure 16**).

L'accélération de la célérité à travers la xénogreffe semble liée à une restriction de la jonction ventriculo-aortique constatée à l'échelle macroscopique lors des prélèvements effectués à 4 mois, sans que la différence entre les 2 sous-groupes atteigne la significativité au niveau de la mesure du diamètre de la jonction ventriculo-aortique.

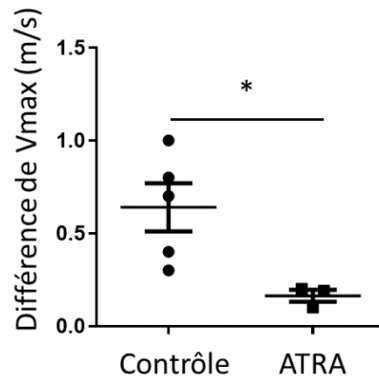


Figure 16. Evolution de la Vmax chez les agneaux des sous-groupes Contrôle et ATRA entre le 1^{er} mois (M1) et le 4^e mois (M4) postopératoire. L'augmentation de la Vmax entre le début et la fin de l'expérience est plus marquée dans le sous-groupe Contrôle par rapport au sous-groupe ATRA (* $p = 0.033$).

2. Analyses macroscopiques et histologiques

Dans les 2 sous-groupes, **les calcifications sur la xénogreffe aortique étaient prédominantes sur la paroi artérielle**. Les feuillets aortiques n'étaient pas calcifiés mais souvent épaissis, équivalents à une SCA (**Figure 17**). Une différence de consistance globale des xénogreffes était palpable à l'inspection macroscopique et liée aux calcifications plus importantes constatées dans les xénogreffes chez les agneaux du sous-groupe Contrôle par rapport à ceux du sous-groupe ATRA. Cette différence de consistance était cependant variable et reste difficile, voire impossible, à prouver (257).

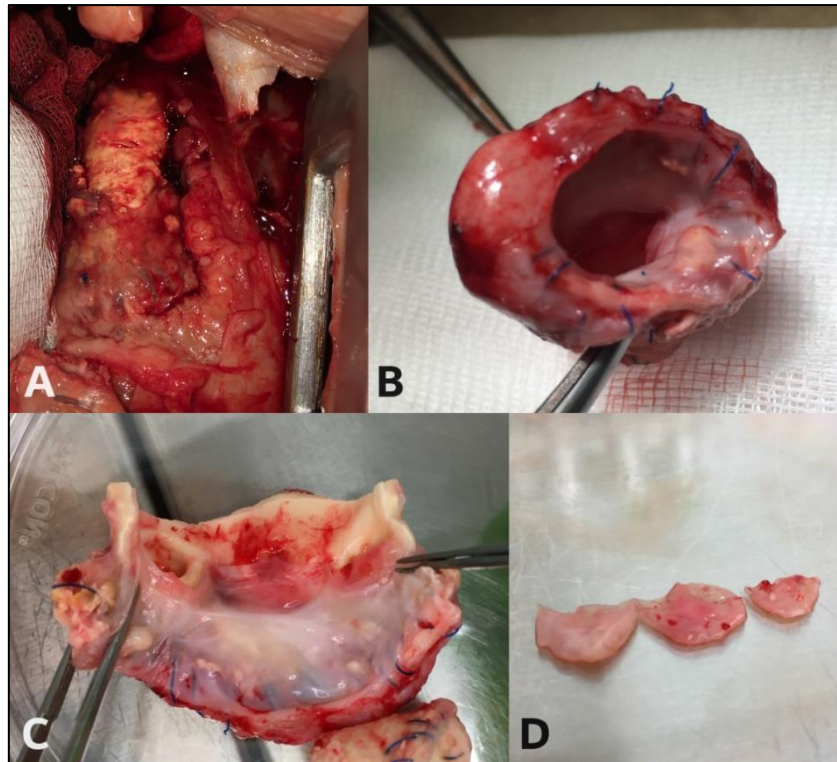


Figure 17. Photographies post-mortem de la xénogreffe aortique implantée chez l'agneau n°2 (Contrôle) au 4^e mois postopératoire. A : *in situ*; B : après explantation (versant proximal); C : après section longitudinale au niveau de la commissure gauche-droite; D : après extraction des feuillets. Noter la calcification importante de la paroi artérielle (A), la contraction de la jonction ventriculo-aortique (B), la formation de nodules calcifiés autour de la jonction ventriculo-aortique (B et C) et la sclérose des feuillets aortiques (D).

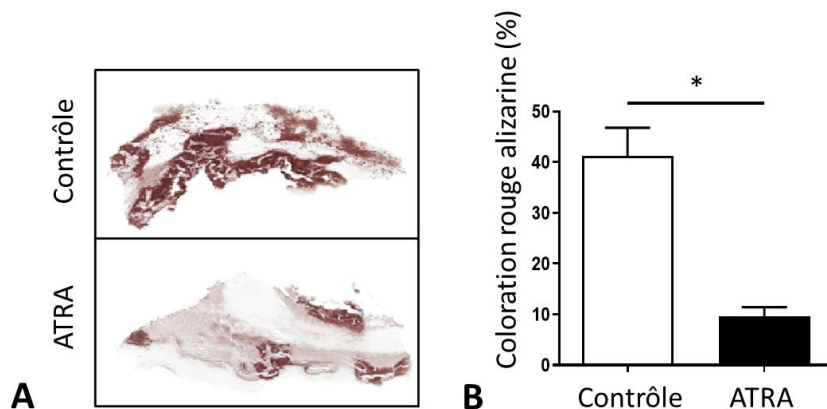


Figure 18. Coloration au rouge alizarine de la paroi artérielle de xénogreffes aortiques. La paroi de l'agneau du sous-groupe Contrôle est plus marquée pour la calcification que celle de l'agneau du sous-groupe ATRA, comme le montre les coupes histologiques (A) et l'analyse de la différence de pourcentage de coloration de la surface des coupes histologiques (B). * $p = 0.005$.

Les analyses en histologie confirment le ressenti perçu en analyse macroscopique, à savoir que **les calcifications étaient majorées dans le sous-groupe Contrôle** par rapport au sous-groupe ATRA ($p = 0.005$) en coloration au rouge alizarine au niveau de la paroi artérielle des xénogreffes (**Figure 18**).

3. Analyses protéiques

Les analyses en Western blot ont retrouvé l'expression de l'ALDH1A1 et de Runx2 dans les xénogreffes aortiques des sous-groupes Contrôle et ATRA (**Figure 19**).

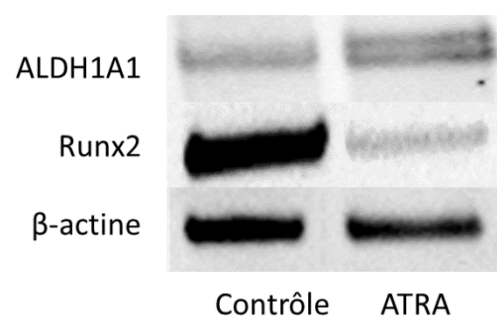


Figure 19. Exemples de Western blots ALDH1A1, Runx2 et β -actine de xénogreffes valvulaires aortiques chez un agneau Contrôle et un agneau ATRA. Marquage moins intense pour ALDH1A1 et plus intense pour Runx2 chez l'agneau Contrôle.

Dans les parois artérielles des xénogreffes aortiques du sous-groupe Contrôle, l'expression de l'ALDH1A1 était diminuée (**Figure 20A**) et l'expression de Runx2 augmentée (**Figure 20B**) significativement par rapport au sous-groupe ATRA : $p = 0.0005$ et $p = 0.044$ respectivement.

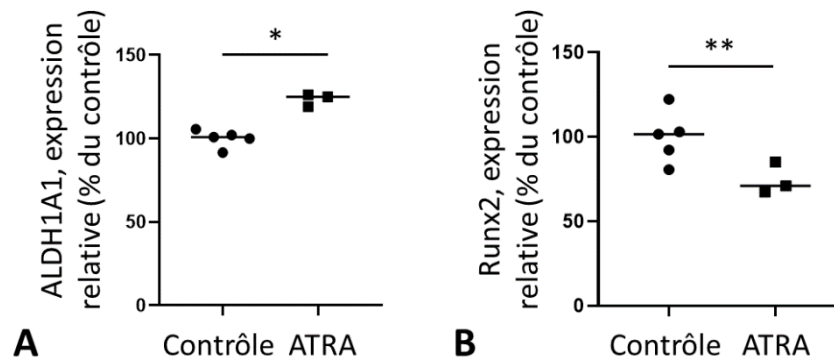


Figure 20. Analyse des différences d'expression protéique entre les xénogreffes aortiques Contrôle et ATRA pour l'ALDH1A1 (A) et Runx2 (B). Expressions moins intenses de l'ALDH1A1 (* $p = 0.0005$) et de Runx2 (** $p = 0.044$) dans le sous-groupe Contrôle et le sous-groupe ATRA respectivement.

Ces résultats dans leur ensemble (échocardiographie, macroscopie, histologie et analyses protéiques) confirment de manière convergente que l'ALDH1A1 est sous-exprimée dans le cadre des calcifications valvulaires aortiques porcines dans le modèle ovin, comme dans les valves aortiques pathologiques humaines. Ils démontrent de plus que **l'ATRA a un effet inhibiteur sur les calcifications valvulaires dans ce modèle *in vivo* chez un grand mammifère.**

DISCUSSION

Etude(s) de la sténose valvulaire aortique

La revue de la littérature sur le sujet, non exhaustive, réalisée dans l'introduction met en lumière la complexité de la physiopathologie de la SVA qui est encore incomplètement élucidée. Les travaux centrés sur les calcifications valvulaires aortiques sont caractérisés par une très grande **hétérogénéité** des méthodologies, que ce soit pour les études *in vitro* et les études *in vivo*, à tel point que certaines conclusions majeures sont contradictoires pour une même voie de signalisation.

Un exemple très illustratif est représenté par l'étude d'une voie de signalisation majeure dans la calcification des valves natives : celle de TGF- β 1. Alors que le rôle pro-calcifiant de TGF- β 1 dans les VIC semblait établi depuis 2003 *in vitro* par Jian *et al.* (26), une remise en cause de ce dogme a été installée progressivement (notamment par Cloyd *et al.* en 2012 (258)) puis confirmée par Jenke *et al.* en 2020 (49) : "**Transforming growth factor- β 1 [...] atténue la calcification du tissu valvulaire**" dans le titre. Il est frappant de constater que les 3 publications en question ont étudié la signalisation de TGF- β 1 avec des VIC provenant de 3 **espèces différentes** (humaines (26), porcines (258) et ovines (49)). Les travaux de Jenke *et al.* se sont distingués surtout par la mise en place d'un milieu de culture en 3 dimensions (feuillet aortiques ovins suspendus) qui aurait permis une interaction des VIC avec la MEC dont le rôle est déterminant dans la pathogénie de la SVA. Cette interaction est absente des manipulations réalisées dans des cultures en 2 dimensions de couches uniques de VIC comme cela est le plus souvent réalisé dans les études.

Alors que la **voie des rétinoïdes** a encore été très peu étudiée dans le cadre de la SVA, une hétérogénéité entre les méthodologies et une contradiction dans les résultats sont déjà à signaler. Huk *et al.* ont démontré qu'un régime surdosé en vitamine A pendant 12 mois était à l'origine de calcifications valvulaires aortiques *in vitro* via RAR et RXR et *in vivo* chez la souris (245). Cette conclusion va cependant à l'encontre des résultats *in vitro* retrouvés dans notre unité de recherche et par Rogers *et al.* (246). Ces derniers auteurs ont démontré que l'acide rétinoïque avait le potentiel de réguler les calcifications valvulaires aortiques à la baisse, dans un modèle d'étude certes *in vitro* (VIC) mais chez l'homme. L'antagonisme des résultats entre ceux de Huk *et al.* et Rogers *et al.* laisse donc penser que les effets des voies de signalisation divergent selon les espèces et que les diverses conclusions doivent être prises avec précaution en fonction de la méthodologie dans le cadre de l'étude de la SVA. En plus d'une variation inter-espèce *in vitro*, des effets antagonistes *in vivo* de la modulation de la voie de signalisation de l'AR au niveau des organes semblent se produire au sein de la même espèce, en l'occurrence la souris : un effet pro-calcifiant sur la masse osseuse a ainsi été retrouvé par Nallamshetty *et al.* par l'inhibition de la voie de l'AR par un KO *ALDH1A1* (221), allant donc à l'encontre des résultats de Huk *et al.* sur la valve aortique.

La multi-modalité des méthodologies doit sans doute être encouragée, ne serait-ce que pour tester des hypothèses *in vitro* sur des VIC humaines issues de pièces opératoires avant de passer aux expérimentations *in vivo* impliquant des sacrifices animaux. L'étude des VIC humaines présente aussi un intérêt certain lorsqu'elles proviennent de valves saines, à savoir que les mises en conditions de culture (surtout pro-calcifiantes) provoquent des réactions plus intenses que chez les VIC pathologiques qui ont déjà été stimulées de manière chronique durant plusieurs décennies au moment de leur étude. Des travaux récents ont ainsi démontré que les VIC constituaient une population hétérogène, dont découlaient des réponses

différentielles (259,260). L'autre avantage est de disposer d'un groupe témoin permettant de mettre en évidence des différences d'expression génétiques ou protéiques **a priori**, tel que cela a été illustré par la démarche par transcriptomique au sein de notre unité de recherche et les approches multi-omiques (98).

La diversité des méthodologies et les résultats contradictoires sus-cités justifient la réalisation de travaux visant à se rapprocher le plus possible d'une application chez l'homme, à savoir fondés sur des modèles *in vivo* chez les grands mammifères. Aussi, une réflexion globale serait probablement pertinente quant à **l'intérêt d'uniformiser les pratiques en recherche appliquée** dans le cadre de la SVA, tel que cela est le cas en recherche clinique dans diverses spécialités (261–266) et en pratique clinique à travers les recommandations diagnostiques et thérapeutiques des sociétés savantes respectives. Cette réflexion a d'ailleurs déjà été initiée notamment par le groupe d'Aikawa au niveau de la méthodologie de l'étude *in vitro*, par la démonstration que les VIC avaient un potentiel de calcification variant en fonction des milieux de culture et du nombre de passages (267,268).

Etude(s) de la détérioration structurelle des bioprothèses (SVD)

L'engouement pour l'étude de la SVD découle directement de l'augmentation de l'implantation des bioprothèses valvulaires dans le cadre de la SVA dont l'incidence est en augmentation constante. Ce champ d'étude est en fait ancien et a été initié par Carpentier *et al.* avec des études cliniques et histopathologiques chez l'homme puis chez l'animal. Ces recherches très précoces ont été réalisées dans les suites des premières implantations avec succès de bioprothèses (traitée avec une solution mercurielle) par Binet *et al.* (dont Carpentier) en 1965 (126), faisant suite à une implantation en Espagne l'année précédente

pour laquelle le patient n'a pas survécu au-delà de J1 postopératoire (expérience non publiée). Dès la fin des années 1960, Carpentier *et al.* ont révélé la présence d'une SVD au sein des bioprothèses, en identifiant déjà la survenue de 3 processus physiopathologiques encore étudiés de nos jours : réactions immunologiques, réactions inflammatoires et fibrose (269). Il faut rappeler que la première série de Binet *et al.* avait étudié l'implantation d'une bioprothèse chez 5 patients et que les prothèses utilisées étaient des valves aortiques porcines (n = 4) et bovine (n = 1) implantées en position sous-coronaire (270). Carpentier *et al.* ont rapidement modifié la conception et le traitement des bioprothèses en montant les feuillets valvulaires sur des armatures (ou stents) et en introduisant un pré-traitement par la glutaraldéhyde dès 1968 (devenue une référence depuis), afin d'augmenter l'immuno-tolérance et la durabilité des tissus hétérologues (269).

Un élément caractérisant la recherche sur les bioprothèses est la diversité des dispositifs disponibles. Contrairement à la pathogénie de la valve aortique native qui est certes complexe mais uniforme au sein d'une même espèce, la SVD des bioprothèses représente un champ d'étude bien plus **hétérogène** en raison de la multitude (128) :

- des industriels
- des modèles chez un même industriel
- des modes d'implantation :
 - Chirurgical : conventionnel, déploiement rapide
 - TAVI : déploiement au ballonnet, dispositif auto-expansible
- des supports externes : avec armature, sans armature
- des tissus utilisés : péricarde bovin, valve aortique porcine, veine jugulaire bovine

- et des traitements chimiques de ces tissus : glutaraldéhyde, acide α -amino-oléique/AOA, photo-oxydation, Tween® 80, glycérolisation etc.

En ce qui concerne les modèles expérimentaux animaux, comme dans l'étude de la SVA, des effets différentiels ont été retrouvés entre les espèces : les propriétés anti-calcifiantes de certains traitements chimiques des bioprothèses dans le modèle d'implantation sous-cutané chez le rat n'étaient pas vérifiées, voire avaient même effets délétères, dans un modèle dynamique chez l'agneau (271).

Les articles publiés au cours des 5 dernières décennies ont donc été nombreux, étudiant l'implantabilité et la réaction des divers tissus dans chacune des 4 valves, l'objectif ultime étant de prolonger la **durabilité** des substituts. D'importantes contributions ont été apportées par les travaux de Frederick Schoen *et al.* (145,254,272–278) principalement dans les années 1980, qui ont beaucoup étudié le rôle du pré-traitement par la glutaraldéhyde et introduit le modèle d'implantation sous-cutané de tissu valvulaire hétérologue chez le rat en 1983 (183), et par ceux de W. R. Eric Jamieson *et al.* (principalement dans les années 1990) qui se sont focalisés sur les résultats cliniques de diverses bioprothèses, en particulier celle de Carpentier-Edwards à court, moyen et long termes (279–284).

Enfin, une percée récente dans la compréhension de la SVD a été réalisée par Sénage *et al.* qui ont étudié de façon multi-modale et en particulier dans une large cohorte humaine le rôle fondamental de l'immunogénicité vis-à-vis des glycanes exprimées dans les bioprothèses malgré les pré-traitements par les industriels (152). Ces auteurs ont donc suggéré un intérêt à la fabrication des bioprothèses avec des tissus déplétés en α Gal et Neu5Gc pour améliorer la performance des substituts par atténuation de la SVD.

Critiques et rationnel du modèle animal utilisé

Comme il l'a été rappelé ci-dessus, l'utilisation de modèles grands mammifères présente un intérêt certain pour l'étude de la SVA et de son traitement par remplacement valvulaire. Le modèle animal utilisé dans nos travaux a présenté beaucoup de **complications** lors de sa manipulation à différents stades (peropératoires et postopératoires), avec en particulier une mortalité précoce très élevée en début d'expérience. Cependant, bien que la littérature soit abondante sur le sujet du remplacement valvulaire par différentes bioprothèses et dans différentes positions chez le mouton, on note qu'il existe très peu de données sur la mortalité opératoire chez les animaux opérés alors qu'il s'agit habituellement d'un critère primaire dans les études chez l'homme, et que ce taux de mortalité, lorsqu'il est dévoilé, peut être très élevé. Le taux de mortalité peut atteindre 30% (198), ou 25% après exclusion de 4 sujets sur 12 dans l'analyse (285).

Causes des complications

La fragilité du modèle s'explique en grande partie par le **petit poids** des sujets opérés (médiane de 23 kg), équivalent à celui des nourrissons chez l'homme. Le poids des agneaux dans notre cohorte était inférieur à celui de la plupart des autres travaux dans lesquels un remplacement valvulaire sous circulation extracorporelle était réalisé (entre 30 et 40 kg le plus souvent (198,247,286)).

L'autre facteur expliquant le taux de mortalité élevé et les complications était le défaut de certains équipements cruciaux pour le monitoring per-CEC, tels que les automates de gaz du sang et d'ACT. Malgré ces conditions dégradées, nous sommes parvenus à proposer un modèle ovin de remplacement valvulaire avec un protocole simplifié.

Le ralentissement de la **courbe d'apprentissage**, pouvant aussi grandement contribuer à l'attrition, était la restriction de l'accès à l'animalerie combinée à la longue durée du traitement (4 mois). En effet, le nombre d'agneaux pouvant être hébergés dans l'animalerie était limité à 4 simultanément car les locaux étaient partagés avec les brebis et les cochons opérés par d'autres unités de recherche. L'idéal aurait été de regrouper le maximum d'interventions sur une durée minimale afin d'optimiser la courbe d'apprentissage. Cette notion de résultats chirurgicaux liés au volume de sujets opérés est déjà une évidence en pratique clinique (287–289). Enfin, le ralentissement de la courbe d'apprentissage a aussi été favorisé par la pandémie de SARS-CoV-2 en mars 2020, qui a non seulement mis fin aux manipulations chez 3 agneaux qui avait passé le cap du 1^{er} mois postopératoire, mais aussi rendu la reprise des expériences plus délicates car repoussées dans le temps (octobre 2020).

Rationnel du modèle

Malgré la fragilité liée au poids (et donc à l'âge jeune) des sujets opérés, nous n'avons pas modifié le protocole pour récupérer des agneaux ou moutons plus âgés, plus gros et donc plus robustes. L'objectif était en effet de pouvoir disposer du modèle le plus fidèle possible d'un point de vue de la reproduction des conditions de la SVD. Il a été démontré de longue date et par de nombreuses publications chez l'homme que **la durabilité des bioprothèses est inversement corrélée à l'âge**. Ceci se vérifie chez les adultes entre les différentes décennies d'âge (290), et encore plus entre les adultes et les enfants chez lesquels les bioprothèses ne sont donc pas indiquées pour une utilisation à long terme en raison de la précocité et de l'intensité de la SVD. Les explications principales à la survenue d'une SVD exacerbée chez les enfants (et donc par extrapolation chez les très jeunes agneaux (198)), décrite dès la fin des

années 1970 (291), reposent sur un métabolisme phospho-calcique en plein développement et sur la réaction d'un système immunitaire encore très naïf dans cette population (292–299). De plus, afin d'accélérer la SVD en raison d'une contrainte temporelle, les xénogreffes aortiques utilisées dans notre étude n'étaient pas traitées chimiquement avant implantation. Le groupe Modèle laisse même supposer que la période d'expérimentation pour chaque animal pourrait être interrompue dès le 2^e mois postopératoire en raison de calcifications objectivées histologiquement et en expression protéique. La preuve de ce concept nécessiterait une confirmation avec la comparaison de 2 groupes d'effectif suffisant (xénogreffe aortique implantée 2 mois vs xénogreffe aortique implantée 4 mois).

Ensuite, bien que la cible anatomique de nos travaux soit les feuillets aortiques en eux-mêmes, nous nous sommes focalisés sur les **calcifications de la paroi** de la xénogreffe aortique. Cette analyse en apparence discutable est en réalité logique compte tenu de nos propres observations et de l'historique des publications sur les bioprothèses porcines en application expérimentale et clinique. La première implantation d'une xénogreffe aortique connue a été rapportée par Duran *et al.* en 1965, avec l'implantation d'une valve aortique porcine dans l'aorte thoracique descendante d'un chien (300), suivie quelques mois plus tard des premières implantations chez l'homme par Binet *et al.* (126). Duran *et al.* avaient déjà noté la localisation préférentielle des calcifications au niveau de paroi artérielle des xénogreffes alors que les feuillets étaient peu dégradés. C'est notamment ce qui a incité Binet *et al.* à modifier la conception de la xénogreffe en réséquant au maximum la paroi artérielle pour les premières implantations. Malgré ces observations, des bioprothèses aortique sans armature ont été commercialisées à partir du début des années 1990 à la faveur de la démonstration de gradients transvalvulaires plus faibles par rapport aux bioprothèses avec armature (247,301). L'une d'entre elles (Freestyle™ Aortic Root, Medtronic, autorisation

de la FDA en 1992) est traitée à l'acide α -amino-oléique et la glutaraldéhyde et ses résultats d'implantation sont satisfaisants à long terme en position aortique (83.3% d'absence d'explantation pour SVD à 15 ans) (302) et à moyen terme en position pulmonaire (303). Les calcifications de la paroi artérielle sont cependant très marquées même en position droite (255,285), compliquant fortement les réinterventions en particulier suite à une intervention de Ross.

La limite principale du modèle ovin de d'implantation de xénogreffe aortique en position pulmonaire est l'environnement hémodynamique auquel la xénogreffe est soumise. En effet, malgré l'exposition au flux et à la tension pariétale en systole et en diastole ventriculaire, la xénogreffe est implantée à la sortie du ventricule droit et est donc soumise à des **pressions pulmonaires**, donc inférieures aux pressions systémiques. Par conséquent, la baisse de la post-charge, donc de la tension pariétale en particulier sur la *fibrosa* et donc de l'activation des voies de signalisation de la SVA qui en découle sont sous-estimées par la baisse de celles-ci. Une solution pour contrer ce biais pourrait être la réalisation d'un cerclage de la bifurcation pulmonaire juste en aval de l'anastomose distale de la xénogreffe aortique implantée en position pulmonaire, afin d'augmenter non seulement la pression artérielle pulmonaire systolique mais surtout la pression artérielle pulmonaire diastolique. Ce cerclage devrait être ajusté pour permettre l'égalisation des pressions pulmonaires et systémiques afin de reproduire à l'identique les conditions de la SVD des bioprothèses en position aortique chez l'homme. Cependant, bien que facilement réalisable d'un point de vue technique, le cerclage de l'artère pulmonaire reste une intervention risquée, comme en témoigne la classification STAT (Society of Thoracic Surgeons – EACTS Congenital Heart Surgery Mortality Categories) qui range cette intervention dans la catégorie 4 (sur 5) avec une mortalité hospitalière attendue de presque 10% (304). Compte tenu du taux de mortalité déjà très élevé en début

d'expérience, nous avons préféré surseoir à cette manœuvre supplémentaire. De plus, l'intérêt d'instaurer un régime de pression systémique dans la circulation pulmonaire dans le modèle utilisé pour nos travaux semble faible car il a été démontré que la SVD des bioprothèses est équivalente en positions aortique et pulmonaire au niveau de la calcification (305).

Acide rétinoïque et calcifications valvulaires aortiques

Les résultats démontrant un **effet anti-calcifiant de l'AR sur les calcifications valvulaires** dans notre modèle *in vivo* chez le grand mammifère confirment les données *in vitro* retrouvées dans notre unité de recherche et par Rogers *et al.* (246). Une modulation cohérente des calcifications a été retrouvée par imagerie (échocardiographie) et histologie. Et plus pertinemment, une modulation de Runx2, centrale dans de multiples voies de signalisation, a été mise en évidence dans ce travail à travers les groupes Modèle (xénogreffe aortique vs sham) et Etude (xénogreffe aortique vs xénogreffe aortique + ATRA). A notre connaissance, la modulation des calcifications valvulaires objectivée par l'expression protéique de Runx2 évaluée en Western blot n'avait pas encore été décrite dans un modèle *in vivo* grand mammifère, toutes voies de signalisation confondues.

Ces résultats encourageant sont à mettre en perspective avec des essais cliniques de forte puissance qui n'ont pas réussi à démontré l'intérêt d'une supplémentation chronique en rétinoïdes, en particulier avec la bêta-carotène, dans la prévention des maladies cardiovasculaires (cardiopathie ischémique et accident vasculaire cérébral) (306–309). L'absence d'effet positif (et également négatif d'ailleurs) des rétinoïdes par voie orale sur la maladie athéromateuse pourrait aussi laisser supposer une inefficacité dans le cadre de la

prévention de la ScA et de la SVA. Des conclusions ne pourraient être tirées cependant que sur la base d'études dédiées spécifiquement à la pathologie valvulaire aortique calcifiante, en particulier étant donné la diversité d'action des voies de signalisation (y compris de l'AR) en fonction des types cellulaires, des organes et des espèces.

Perspective(s)

Malgré les défis qu'elle impose en termes de compréhension des mécanismes physiopathologiques et de prise en charge médico-chirurgicale qui cherche continuellement à être la plus optimale possible, l'augmentation de la prévalence de la SVA peut être considérée malgré tout comme **un critère de bonne santé d'une population générale**. En effet, la SVA s'observe chez une population âgée qui est donc témoin de l'amélioration des conditions et de l'espérance de vie dans une population donnée (observée durant les dernières décennies dans les pays à haut revenu), alors qu'à l'inverse la survenue des valvulopathies rhumatismales est le reflet d'une difficulté d'accès aux soins dans les pays à faible revenu. Le croisement attendu dans les prochaines décennies des taux d'incidence de SVA (à la hausse) et des valvulopathies rhumatismales (à la baisse) est donc quelque part un motif d'optimisme quant à l'état de santé global de l'espèce humaine.

Le futur de la compréhension et de la prise en charge de la SVA passe par la poursuite des recherches sur la pathogénie de la valve aortique native, mais aussi par l'étude de la SVD pour laquelle des solutions peuvent être proposées, tant au niveau de la conception de la bioprothèse elle-même, qu'au niveau pharmacologique. Ainsi, le débat sur un traitement par **statines** dans les suites d'un RVA, inefficaces dans la prévention de la SVA, a été relancé récemment par la présentation de résultats d'une cohorte multicentrique de près de 12 000

patients montrant rétrospectivement un bénéfice net des **statines** en termes de mortalité et d'évènements cardiovasculaires majeurs sans analyser la SVD (Pan *et al.* EACTS 37th Annual Meeting, octobre 2023, Vienne, Autriche), alors que les données cliniques n'avaient pas été concluantes jusqu'à présent (310–312).

A cela s'ajoute l'émergence d'un nouvel axe de recherche, hybride, "grâce" à l'avènement du **TAVI**. En effet, le TAVI combine à la fois l'implantation d'une bioprothèse avec les risques inhérents de SVD et la poursuite du processus pathologique de calcification de la valve aortique native puisque celle-ci n'est pas extraite lors de la procédure, mais écrasée par la bioprothèse stentée. En pratique clinique, le fait de craquer la valve aortique calcifiée est connu pour être responsable d'accidents vasculaires cérébraux. En mécanistique, il a été suggéré que la SVD pourrait être majorée dans les bioprothèses TAVI notamment par la poursuite de l'activation de la coagulation et de la dysfonction endothéliale sur les feuillets de la valve native, aboutissant à la formation de microthrombi pouvant "contaminer" la bioprothèse adjacente (81). Par conséquent, il existe un intérêt pour un traitement anti-agrégant plaquettaire (plutôt unique que double (313–315)) et encore un questionnement sur la supériorité des anti-vitamines K par rapport aux nouveaux anticoagulants oraux (316,317). Il ne semble cependant pas logique d'administrer de la warfarine d'un point de vue mécanistique, compte tenu de ses effets pro-calcifiant sur la valve aortique native.

Quant aux innovations techniques pouvant être apportées aux substituts valvulaires grâce la transposition des recherches, Sénage *et al.* et d'autres auteurs ont suggéré la **déplétion des glycanes** au niveau des tissus biologiques implantés. Enfin, en s'inspirant de ce qui a été réalisé très récemment dans une prothèse mécanique pour améliorer sa biocompatibilité (anti-thrombotique), un traitement de surface des bioprothèses pourrait aussi être proposé

(318). Un **coating** de la xénogreffe aortique porcine avec l'AR pourrait être réalisé dans une prochaine série de manipulations avant une application chez l'homme.

CONCLUSION

En conclusion, le remplacement valvulaire sous circulation extracorporelle chez l'agneau de petit poids est réalisable mais potentiellement très délicat. De plus, la modulation de la voie l'acide rétinoïque semble être une piste prometteuse pour le ralentissement de la dégénérescence des bioprothèses valvulaires par diminution des calcifications.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse de doctorat d'université ont été réalisés au sein de l'Unité Mixte de Recherche 1011 (Récepteurs Nucléaires, Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires) – Equipe 2 (heART disease, flow disturbances and haEMostals) et financés par une bourse de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE14-0014 - projet RETINAVS) **(Annexe 4).**

BIBLIOGRAPHIE

1. Global health estimates: Leading causes of death [Internet]. [cited 2023 Oct 14]. Available from: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>
2. Watkins DA, Johnson CO, Colquhoun SM, Karthikeyan G, Beaton A, Bukhman G, et al. Global, Regional, and National Burden of Rheumatic Heart Disease, 1990-2015. *N Engl J Med*. 2017 Aug 24;377(8):713–22.
3. Yadgir S, Johnson CO, Aboyans V, Adebayo OM, Adedoyin RA, Afarideh M, et al. Global, Regional, and National Burden of Calcific Aortic Valve and Degenerative Mitral Valve Diseases, 1990-2017. *Circulation*. 2020 May 26;141(21):1670–80.
4. Iung B, Baron G, Butchart EG, Delahaye F, Gohlke-Bärwolf C, Levang OW, et al. A prospective survey of patients with valvular heart disease in Europe: The Euro Heart Survey on Valvular Heart Disease. *Eur Heart J*. 2003 Jul;24(13):1231–43.
5. Otto CM, Lind BK, Kitzman DW, Gersh BJ, Siscovick DS. Association of aortic-valve sclerosis with cardiovascular mortality and morbidity in the elderly. *N Engl J Med*. 1999 Jul 15;341(3):142–7.
6. Moore M, Chen J, Mallow PJ, Rizzo JA. The direct health-care burden of valvular heart disease: evidence from US national survey data. *Clinicoecon Outcomes Res*. 2016;8:613–27.
7. Danielsen R, Aspelund T, Harris TB, Gudnason V. The prevalence of aortic stenosis in the elderly in Iceland and predictions for the coming decades: the AGES-Reykjavík study. *Int J Cardiol*. 2014 Oct 20;176(3):916–22.

8. Clark MA, Arnold SV, Duhay FG, Thompson AK, Keyes MJ, Svensson LG, et al. Five-year clinical and economic outcomes among patients with medically managed severe aortic stenosis: results from a Medicare claims analysis. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes*. 2012 Sep 1;5(5):697–704.
9. 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*. 2021 Aug 28;ehab395.
10. 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: Executive Summary: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2021 Feb 2;143(5):e35–71.
11. Gittenberger-de Groot AC, Bartelings MM, Deruiter MC, Poelmann RE. Basics of cardiac development for the understanding of congenital heart malformations. *Pediatr Res*. 2005 Feb;57(2):169–76.
12. Männer J. The anatomy of cardiac looping: a step towards the understanding of the morphogenesis of several forms of congenital cardiac malformations. *Clin Anat*. 2009 Jan;22(1):21–35.
13. Hutson MR, Kirby ML. Model systems for the study of heart development and disease. Cardiac neural crest and conotruncal malformations. *Semin Cell Dev Biol*. 2007 Feb;18(1):101–10.
14. Maron BJ, Hutchins GM. The development of the semilunar valves in the human heart. *Am J Pathol*. 1974 Feb;74(2):331–44.

15. Nakajima Y, Mironov V, Yamagishi T, Nakamura H, Markwald RR. Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3. *Dev Dyn*. 1997 Jul;209(3):296–309.
16. Driscoll K, Cruz AD, Butcher JT. Inflammatory and Biomechanical Drivers of Endothelial-Interstitial Interactions in Calcific Aortic Valve Disease. *Circ Res*. 2021 Apr 30;128(9):1344–70.
17. Weind KL, Ellis CG, Boughner DR. The aortic valve blood supply. *J Heart Valve Dis*. 2000 Jan;9(1):1–7; discussion 7-8.
18. Weind KL, Boughner DR, Rigutto L, Ellis CG. Oxygen diffusion and consumption of aortic valve cusps. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Dec;281(6):H2604-2611.
19. Rabkin-Aikawa E, Farber M, Aikawa M, Schoen FJ. Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves. *J Heart Valve Dis*. 2004 Sep;13(5):841–7.
20. Richards J, El-Hamamsy I, Chen S, Sarang Z, Sarathchandra P, Yacoub MH, et al. Side-specific endothelial-dependent regulation of aortic valve calcification: interplay of hemodynamics and nitric oxide signaling. *Am J Pathol*. 2013 May;182(5):1922–31.
21. Hjortnaes J, Shapero K, Goettsch C, Hutcheson JD, Keegan J, Kluin J, et al. Valvular interstitial cells suppress calcification of valvular endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2015 Sep;242(1):251–60.
22. Mönckeberg DJG. Der normale histologische Bau und die Sklerose der Aortenklappen. *Virchows Arch path Anat*. 1904 Jun 1;176(3):472–514.

23. Mohler ER, Chawla MK, Chang AW, Vyavahare N, Levy RJ, Graham L, et al. Identification and characterization of calcifying valve cells from human and canine aortic valves. *J Heart Valve Dis.* 1999 May;8(3):254–60.
24. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI. The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol.* 2007 Nov;171(5):1407–18.
25. Chester AH, Taylor PM. Molecular and functional characteristics of heart-valve interstitial cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2007 Aug 29;362(1484):1437–43.
26. Jian B, Narula N, Li Q yi, Mohler ER, Levy RJ. Progression of aortic valve stenosis: TGF-beta1 is present in calcified aortic valve cusps and promotes aortic valve interstitial cell calcification via apoptosis. *Ann Thorac Surg.* 2003 Feb;75(2):457–65; discussion 465-466.
27. Huang HYS, Liao J, Sacks MS. In-situ deformation of the aortic valve interstitial cell nucleus under diastolic loading. *J Biomech Eng.* 2007 Dec;129(6):880–9.
28. 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 Aug;90(2):844–53.
29. Yip CYY, Simmons CA. The aortic valve microenvironment and its role in calcific aortic valve disease. *Cardiovasc Pathol.* 2011;20(3):177–82.
30. Aikawa E, Nahrendorf M, Figueiredo JL, Swirski FK, Shtatland T, Kohler RH, et al. Osteogenesis associates with inflammation in early-stage atherosclerosis evaluated by molecular imaging in vivo. *Circulation.* 2007 Dec 11;116(24):2841–50.
31. Mohler ER, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001 Mar 20;103(11):1522–8.

32. Li G, Qiao W, Zhang W, Li F, Shi J, Dong N. The shift of macrophages toward M1 phenotype promotes aortic valvular calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2017 Jun;153(6):1318-1327.e1.
33. Tagzirt M, Rosa M, Corseaux D, Vincent F, Vincentelli A, Daoudi M, et al. Modulation of inflammatory M1-macrophages phenotype by valvular interstitial cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2023 Nov;166(5):e377–89.
34. Soini Y, Salo T, Satta J. Angiogenesis is involved in the pathogenesis of nonrheumatic aortic valve stenosis. *Hum Pathol.* 2003 Aug;34(8):756–63.
35. Chen HY, Engert JC, Thanassoulis G. Risk factors for valvular calcification. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2019 Apr;26(2):96–102.
36. Thaden JJ, Nkomo VT, Suri RM, Maleszewski JJ, Soderberg DJ, Clavel MA, et al. Sex-related differences in calcific aortic stenosis: correlating clinical and echocardiographic characteristics and computed tomography aortic valve calcium score to excised aortic valve weight. *Eur Heart J.* 2016 Feb 21;37(8):693–9.
37. Simard L, Côté N, Dagenais F, Mathieu P, Couture C, Trahan S, et al. Sex-Related Discordance Between Aortic Valve Calcification and Hemodynamic Severity of Aortic Stenosis: Is Valvular Fibrosis the Explanation? *Circ Res.* 2017 Feb 17;120(4):681–91.
38. Hoffman JIE, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002 Jun 19;39(12):1890–900.
39. Michelena HI, Della Corte A, Evangelista A, Maleszewski JJ, Edwards WD, Roman MJ, et al. International consensus statement on nomenclature and classification of the congenital

bicuspid aortic valve and its aortopathy, for clinical, surgical, interventional and research purposes. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2021 Jul 7;S0022-5223(21)00973-9.

40. Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, et al. Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 2005 Sep 8;437(7056):270–4.

41. Phillips HM, Mahendran P, Singh E, Anderson RH, Chaudhry B, Henderson DJ. Neural crest cells are required for correct positioning of the developing outflow cushions and pattern the arterial valve leaflets. *Cardiovasc Res*. 2013 Aug 1;99(3):452–60.

42. Roberts WC, Ko JM. Frequency by decades of unicuspid, bicuspid, and tricuspid aortic valves in adults having isolated aortic valve replacement for aortic stenosis, with or without associated aortic regurgitation. *Circulation*. 2005 Feb 22;111(7):920–5.

43. Sabet HY, Edwards WD, Tazelaar HD, Daly RC. Congenitally Bicuspid Aortic Valves: A Surgical Pathology Study of 542 Cases (1991 Through 1996) and a Literature Review of 2,715 Additional Cases. *Mayo Clinic Proceedings*. 1999 Jan;74(1):14–26.

44. Soquet J, Juthier F, Richardson M, Rousse N, Mugnier A, Coisne A, et al. P671 Impaired left ventricular systolic function in patients with stenotic bicuspid aortic valve at the time of aortic valve replacement: a single-institution cohort of 425 patients. *European Heart Journal*. 2018 Aug 1;39(suppl_1):ehy564.P671.

45. Azhar M, Runyan RB, Gard C, Sanford LP, Miller ML, Andringa A, et al. Ligand-specific function of transforming growth factor beta in epithelial-mesenchymal transition in heart development. *Dev Dyn*. 2009 Feb;238(2):431–42.

46. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol.* 1993 Jul;122(1):103–11.
47. Walker GA, Masters KS, Shah DN, Anseth KS, Leinwand LA. Valvular myofibroblast activation by transforming growth factor-beta: implications for pathological extracellular matrix remodeling in heart valve disease. *Circ Res.* 2004 Aug 6;95(3):253–60.
48. Varshney R, Murphy B, Woolington S, Ghafoory S, Chen S, Robison T, et al. Inactivation of platelet-derived TGF- β 1 attenuates aortic stenosis progression in a robust murine model. *Blood Adv.* 2019 Mar 12;3(5):777–88.
49. Jenke A, Kistner J, Saradar S, Chekhoeva A, Yazdanyar M, Bergmann AK, et al. Transforming growth factor- β 1 promotes fibrosis but attenuates calcification of valvular tissue applied as a three-dimensional calcific aortic valve disease model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2020 Nov 1;319(5):H1123–41.
50. Hjortnaes J, Goettsch C, Hutcheson JD, Camci-Unal G, Lax L, Scherer K, et al. Simulation of early calcific aortic valve disease in a 3D platform: A role for myofibroblast differentiation. *J Mol Cell Cardiol.* 2016 May;94:13–20.
51. Wang J, Greene SB, Martin JF. BMP signaling in congenital heart disease: new developments and future directions. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2011 Jun;91(6):441–8.
52. Yamagishi T, Nakajima Y, Miyazono K, Nakamura H. Bone morphogenetic protein-2 acts synergistically with transforming growth factor-beta3 during endothelial-mesenchymal transformation in the developing chick heart. *J Cell Physiol.* 1999 Jul;180(1):35–45.

53. Tachi K, Takami M, Sato H, Mochizuki A, Zhao B, Miyamoto Y, et al. Enhancement of bone morphogenetic protein-2-induced ectopic bone formation by transforming growth factor- β 1. *Tissue Eng Part A*. 2011 Mar;17(5–6):597–606.
54. Song R, Fullerton DA, Ao L, Zheng D, Zhao K seng, Meng X. BMP-2 and TGF- β 1 mediate biglycan-induced pro-osteogenic reprogramming in aortic valve interstitial cells. *J Mol Med (Berl)*. 2015 Apr;93(4):403–12.
55. Simmons CA, Grant GR, Manduchi E, Davies PF. Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves. *Circ Res*. 2005 Apr 15;96(7):792–9.
56. Ankeny RF, Thourani VH, Weiss D, Vega JD, Taylor WR, Nerem RM, et al. Preferential activation of SMAD1/5/8 on the fibrosa endothelium in calcified human aortic valves--association with low BMP antagonists and SMAD6. *PLoS One*. 2011;6(6):e20969.
57. Garside VC, Chang AC, Karsan A, Hoodless PA. Co-ordinating Notch, BMP, and TGF- β signaling during heart valve development. *Cell Mol Life Sci*. 2013 Aug;70(16):2899–917.
58. Peacock JD, Levay AK, Gillaspie DB, Tao G, Lincoln J. Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo. *Circ Res*. 2010 Mar 5;106(4):712–9.
59. Bosse K, Hans CP, Zhao N, Koenig SN, Huang N, Guggilam A, et al. Endothelial nitric oxide signaling regulates Notch1 in aortic valve disease. *J Mol Cell Cardiol*. 2013 Jul;60:27–35.
60. Hurlstone AFL, Haramis APG, Wienholds E, Begthel H, Korving J, Van Eeden F, et al. The Wnt/beta-catenin pathway regulates cardiac valve formation. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):633–7.

61. Zanotti S, Smerdel-Ramoya A, Stadmeier L, Durant D, Radtke F, Canalis E. Notch inhibits osteoblast differentiation and causes osteopenia. *Endocrinology*. 2008 Aug;149(8):3890–9.
62. Chen JH, Chen WLK, Sider KL, Yip CY, Simmons CA. β -catenin mediates mechanically regulated, transforming growth factor- β 1-induced myofibroblast differentiation of aortic valve interstitial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Mar;31(3):590–7.
63. Abou Ziki MD, Mani A. Wnt signaling, a novel pathway regulating blood pressure? State of the art review. *Atherosclerosis*. 2017 Jul;262:171–8.
64. Caira FC, Stock SR, Gleason TG, McGee EC, Huang J, Bonow RO, et al. Human degenerative valve disease is associated with up-regulation of low-density lipoprotein receptor-related protein 5 receptor-mediated bone formation. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Apr 18;47(8):1707–12.
65. Nsaibia MJ, Boulanger MC, Bouchareb R, Mkannez G, Le Quang K, Hadji F, et al. OxLDL-derived lysophosphatidic acid promotes the progression of aortic valve stenosis through a LPAR1-RhoA-NF- κ B pathway. *Cardiovasc Res*. 2017 Sep 1;113(11):1351–63.
66. Albanese I, Yu B, Al-Kindi H, Barratt B, Ott L, Al-Refai M, et al. Role of Noncanonical Wnt Signaling Pathway in Human Aortic Valve Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017 Mar;37(3):543–52.
67. Ito Y, Miyazono K. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Feb;13(1):43–7.

68. Pho M, Lee W, Watt DR, Laschinger C, Simmons CA, McCulloch CA. Cofilin is a marker of myofibroblast differentiation in cells from porcine aortic cardiac valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Apr;294(4):H1767-1778.
69. Benton JA, Kern HB, Leinwand LA, Mariner PD, Anseth KS. Statins block calcific nodule formation of valvular interstitial cells by inhibiting alpha-smooth muscle actin expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1950–7.
70. Osman L, Yacoub MH, Latif N, Amrani M, Chester AH. Role of human valve interstitial cells in valve calcification and their response to atorvastatin. *Circulation*. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I547-552.
71. Monzack EL, Gu X, Masters KS. Efficacy of simvastatin treatment of valvular interstitial cells varies with the extracellular environment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Feb;29(2):246–53.
72. Maranhão RC, Carvalho PO, Strunz CC, Pileggi F. Lipoprotein (a): structure, pathophysiology and clinical implications. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Jul;103(1):76–84.
73. Kronenberg F, Mora S, Stroes ESG, Ference BA, Arsenault BJ, Berglund L, et al. Lipoprotein(a) in atherosclerotic cardiovascular disease and aortic stenosis: a European Atherosclerosis Society consensus statement. *Eur Heart J*. 2022 Oct 14;43(39):3925–46.
74. Koschinsky ML, Boffa MB. Oxidized phospholipid modification of lipoprotein(a): Epidemiology, biochemistry and pathophysiology. *Atherosclerosis*. 2022 May;349:92–100.
75. Thanassoulis G, Campbell CY, Owens DS, Smith JG, Smith AV, Peloso GM, et al. Genetic associations with valvular calcification and aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2013 Feb 7;368(6):503–12.

76. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Feb 11;63(5):470–7.
77. Bouchareb R, Mahmut A, Nsaibia MJ, Boulanger MC, Dahou A, Lépine JL, et al. Autotaxin Derived From Lipoprotein(a) and Valve Interstitial Cells Promotes Inflammation and Mineralization of the Aortic Valve. *Circulation*. 2015 Aug 25;132(8):677–90.
78. Saga H, Ohhata A, Hayashi A, Katoh M, Maeda T, Mizuno H, et al. A novel highly potent autotaxin/ENPP2 inhibitor produces prolonged decreases in plasma lysophosphatidic acid formation in vivo and regulates urethral tension. *PLoS One*. 2014;9(4):e93230.
79. Capoulade R, Chan KL, Yeang C, Mathieu P, Bossé Y, Dumesnil JG, et al. Oxidized Phospholipids, Lipoprotein(a), and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Sep 15;66(11):1236–46.
80. Zheng KH, Tsimikas S, Pawade T, Kroon J, Jenkins WSA, Doris MK, et al. Lipoprotein(a) and Oxidized Phospholipids Promote Valve Calcification in Patients With Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2019 May 7;73(17):2150–62.
81. Trimaille A, Hmadeh S, Matsushita K, Marchandot B, Kauffenstein G, Morel O. Aortic stenosis and the haemostatic system. *Cardiovasc Res*. 2023 Jun 13;119(6):1310–23.
82. Bouchareb R, Boulanger MC, Tastet L, Mkannez G, Nsaibia MJ, Hadji F, et al. Activated platelets promote an osteogenic programme and the progression of calcific aortic valve stenosis. *Eur Heart J*. 2019 May 1;40(17):1362–73.
83. Breyne J, Juthier F, Corseaux D, Marechaux S, Zawadzki C, Jeanpierre E, et al. Atherosclerotic-like process in aortic stenosis: activation of the tissue factor-thrombin

pathway and potential role through osteopontin alteration. *Atherosclerosis*. 2010 Dec;213(2):369–76.

84. Gendron N, Rosa M, Blandinieres A, Sottejeau Y, Rossi E, Van Belle E, et al. Human Aortic Valve Interstitial Cells Display Proangiogenic Properties During Calcific Aortic Valve Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2021 Jan;41(1):415–29.

85. Levy RJ, Zenker JA, Lian JB. Vitamin K-dependent calcium binding proteins in aortic valve calcification. *J Clin Invest*. 1980 Feb;65(2):563–6.

86. Krüger T, Oelenberg S, Kaesler N, Schurgers LJ, van de Sandt AM, Boor P, et al. Warfarin induces cardiovascular damage in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Nov;33(11):2618–24.

87. Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin causes rapid calcification of the elastic lamellae in rat arteries and heart valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998 Sep;18(9):1400–7.

88. Lerner RG, Aronow WS, Sekhri A, Palaniswamy C, Ahn C, Singh T, et al. Warfarin use and the risk of valvular calcification. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2009 Dec 1;7(12):2023–7.

89. Yamamoto K, Koretsune Y, Akasaka T, Kisanuki A, Ohte N, Takenaka T, et al. Effects of vitamin K antagonist on aortic valve degeneration in non-valvular atrial fibrillation patients: Prospective 4-year observational study. *Thromb Res*. 2017 Dec;160:69–75.

90. Sønderskov PS, Lindholt JS, Hallas J, Gerke O, Hasifc S, Lambrechtsen J, et al. Association of aortic valve calcification and vitamin K antagonist treatment. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2020 Jul 1;21(7):718–24.

91. Brandenburg VM, Reinartz S, Kaesler N, Krüger T, Dirrichs T, Kramann R, et al. Slower Progress of Aortic Valve Calcification With Vitamin K Supplementation: Results From a Prospective Interventional Proof-of-Concept Study. *Circulation*. 2017 May 23;135(21):2081–3.
92. Venardos N, Gergen AK, Jarrett M, Weyant MJ, Reece TB, Meng X, et al. Warfarin Induces Calcification of the Aortic Valve Through Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 and β -catenin Signaling. *Ann Thorac Surg*. 2022 Mar;113(3):824–35.
93. Deng XS, Meng X, Fullerton D, Stone M, Jaggars J. Complement Upregulates Runx-2 to Induce Profibrogenic Change in Aortic Valve Interstitial Cells. *Ann Thorac Surg*. 2021 Dec;112(6):1962–72.
94. Uffelmann E, Huang QQ, Munung NS, de Vries J, Okada Y, Martin AR, et al. Genome-wide association studies. *Nat Rev Methods Primers*. 2021 Aug 26;1(1):1–21.
95. Yu Chen H, Dina C, Small AM, Shaffer CM, Levinson RT, Helgadóttir A, et al. Dyslipidemia, inflammation, calcification, and adiposity in aortic stenosis: a genome-wide study. *Eur Heart J*. 2023 Jun 1;44(21):1927–39.
96. Small AM, Peloso GM, Linefsky J, Aragam J, Galloway A, Tanukonda V, et al. Multiancestry Genome-Wide Association Study of Aortic Stenosis Identifies Multiple Novel Loci in the Million Veteran Program. *Circulation*. 2023 Mar 21;147(12):942–55.
97. Schlotter F, Halu A, Goto S, Blaser MC, Body SC, Lee LH, et al. Spatiotemporal Multi-Omics Mapping Generates a Molecular Atlas of the Aortic Valve and Reveals Networks Driving Disease. *Circulation*. 2018 Jul 24;138(4):377–93.

98. Blaser MC, Kraler S, Lüscher TF, Aikawa E. Multi-Omics Approaches to Define Calcific Aortic Valve Disease Pathogenesis. *Circ Res*. 2021 Apr 30;128(9):1371–97.
99. Liu M, Luo M, Sun H, Ni B, Shao Y. Integrated Bioinformatics Analysis Predicts the Key Genes Involved in Aortic Valve Calcification: From Hemodynamic Changes to Extracellular Remodeling. *Tohoku J Exp Med*. 2017 Dec;243(4):263–73.
100. Zhang Y, Ma L. Identification of key genes and pathways in calcific aortic valve disease by bioinformatics analysis. *J Thorac Dis*. 2019 Dec;11(12):5417–26.
101. Wang D, Xiong T, Yu W, Liu B, Wang J, Xiao K, et al. Predicting the Key Genes Involved in Aortic Valve Calcification Through Integrated Bioinformatics Analysis. *Front Genet*. 2021;12:650213.
102. Otto CM, Burwash IG, Legget ME, Munt BI, Fujioka M, Healy NL, et al. Prospective study of asymptomatic valvular aortic stenosis. Clinical, echocardiographic, and exercise predictors of outcome. *Circulation*. 1997 May 6;95(9):2262–70.
103. G  n  reux P, Stone GW, O’Gara PT, Marquis-Gravel G, Redfors B, Giustino G, et al. Natural History, Diagnostic Approaches, and Therapeutic Strategies for Patients With Asymptomatic Severe Aortic Stenosis. *J Am Coll Cardiol*. 2016 May 17;67(19):2263–88.
104. Lund O, Nielsen TT, Emmertsen K, Fl   C, Rasmussen B, Jensen FT, et al. Mortality and worsening of prognostic profile during waiting time for valve replacement in aortic stenosis. *Thorac Cardiovasc Surg*. 1996 Dec;44(6):289–95.
105. Lancellotti P, Donal E, Magne J, Moonen M, O’Connor K, Daubert JC, et al. Risk stratification in asymptomatic moderate to severe aortic stenosis: the importance of the valvular, arterial and ventricular interplay. *Heart*. 2010 Sep;96(17):1364–71.

106. Ratwatte S, Stewart S, Strange G, Playford D, Celermajer DS. Prevalence of pulmonary hypertension in aortic stenosis and its influence on outcomes. *Heart*. 2023 Aug 11;109(17):1319–26.
107. Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med*. 2005 Jun 9;352(23):2389–97.
108. Chan KL, Teo K, Tam J, Dumesnil JG, Astronomer Investigators. Rationale, design, and baseline characteristics of a randomized trial to assess the effect of cholesterol lowering on the progression of aortic stenosis: the Aortic Stenosis Progression Observation: Measuring Effects of Rosuvastatin (ASTRONOMER) trial. *Am Heart J*. 2007 Jun;153(6):925–31.
109. Dichtl W, Alber HF, Feuchtnner GM, Hintringer F, Reinthaler M, Bartel T, et al. Prognosis and risk factors in patients with asymptomatic aortic stenosis and their modulation by atorvastatin (20 mg). *Am J Cardiol*. 2008 Sep 15;102(6):743–8.
110. 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 Sep 25;359(13):1343–56.
111. van der Linde D, Yap SC, van Dijk APJ, Budts W, Pieper PG, van der Burgh PH, et al. Effects of rosuvastatin on progression of stenosis in adult patients with congenital aortic stenosis (PROCAS Trial). *Am J Cardiol*. 2011 Jul 15;108(2):265–71.
112. Yeang C, Hung MY, Byun YS, Clopton P, Yang X, Witztum JL, et al. Effect of therapeutic interventions on oxidized phospholipids on apolipoprotein B100 and lipoprotein(a). *J Clin Lipidol*. 2016;10(3):594–603.

113. HPS2-THRIVE Collaborative Group, Landray MJ, Haynes R, Hopewell JC, Parish S, Aung T, et al. Effects of extended-release niacin with laropiprant in high-risk patients. *N Engl J Med*. 2014 Jul 17;371(3):203–12.
114. Xie C, Shen Y, Hu W, Chen Z, Li Y. Angiotensin II promotes an osteoblast-like phenotype in porcine aortic valve myofibroblasts. *Aging Clin Exp Res*. 2016 Apr;28(2):181–7.
115. Helske S, Lindstedt KA, Laine M, Mäyränpää M, Werkkala K, Lommi J, et al. Induction of local angiotensin II-producing systems in stenotic aortic valves. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Nov 2;44(9):1859–66.
116. Rosenhek R, Rader F, Loho N, Gabriel H, Heger M, Klaar U, et al. Statins but not angiotensin-converting enzyme inhibitors delay progression of aortic stenosis. *Circulation*. 2004 Sep 7;110(10):1291–5.
117. Bull S, Loudon M, Francis JM, Joseph J, Gerry S, Karamitsos TD, et al. A prospective, double-blind, randomized controlled trial of the angiotensin-converting enzyme inhibitor Ramipril In Aortic Stenosis (RIAS trial). *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2015 Aug;16(8):834–41.
118. Lindman BR, Zajarias A, Madrazo JA, Shah J, Gage BF, Novak E, et al. Effects of phosphodiesterase type 5 inhibition on systemic and pulmonary hemodynamics and ventricular function in patients with severe symptomatic aortic stenosis. *Circulation*. 2012 May 15;125(19):2353–62.
119. Hutcheson JD, Chen J, Sewell-Loftin MK, Ryzhova LM, Fisher CI, Su YR, et al. Cadherin-11 regulates cell-cell tension necessary for calcific nodule formation by valvular myofibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Jan;33(1):114–20.

120. Bowen CJ, Zhou J, Sung DC, Butcher JT. Cadherin-11 coordinates cellular migration and extracellular matrix remodeling during aortic valve maturation. *Dev Biol.* 2015 Nov 1;407(1):145–57.
121. Clark CR, Bowler MA, Snider JC, Merryman WD. Targeting Cadherin-11 Prevents Notch1-Mediated Calcific Aortic Valve Disease. *Circulation.* 2017 Jun 13;135(24):2448–50.
122. Bowler MA, Raddatz MA, Johnson CL, Lindman BR, Merryman WD. Celecoxib Is Associated With Dystrophic Calcification and Aortic Valve Stenosis. *JACC Basic Transl Sci.* 2019 Apr;4(2):135–43.
123. Pawade TA, Doris MK, Bing R, White AC, Forsyth L, Evans E, et al. Effect of Denosumab or Alendronic Acid on the Progression of Aortic Stenosis: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Circulation.* 2021 Jun 22;143(25):2418–27.
124. Coisne A, Lancellotti P, Habib G, Garbi M, Dahl JS, Barbanti M, et al. ACC/AHA and ESC/EACTS Guidelines for the Management of Valvular Heart Diseases: JACC Guideline Comparison. *J Am Coll Cardiol.* 2023 Aug 22;82(8):721–34.
125. Hufnagel CA, Harvey WP, Rabil PJ, McDERMOTT TF. Surgical correction of aortic insufficiency. *Surgery.* 1954 May;35(5):673–83.
126. Binet JP, Duran CG, Carpenter A, Langlois J. Heterologous aortic valve transplantation. *Lancet.* 1965 Dec 18;2(7425):1275.
127. Jahangiri M, Hussain A, Akowuah E. Minimally invasive surgical aortic valve replacement. *Heart.* 2019 Mar;105(Suppl 2):s10–5.

128. Rodriguez-Gabella T, Voisine P, Puri R, Pibarot P, Rodés-Cabau J. Aortic Bioprosthetic Valve Durability: Incidence, Mechanisms, Predictors, and Management of Surgical and Transcatheter Valve Degeneration. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Aug 22;70(8):1013–28.
129. Kerwin AJ, Lenkei SC, Wilson DR. Aortic-valve homograft in the treatment of aortic insufficiency. Report of nine cases, with one followed for six years. *N Engl J Med*. 1962 Apr 26;266:852–7.
130. Ross DN. Replacement of aortic and mitral valves with a pulmonary autograft. *Lancet*. 1967 Nov 4;2(7523):956–8.
131. Cribier A, Eltchaninoff H, Bash A, Borenstein N, Tron C, Bauer F, et al. Percutaneous transcatheter implantation of an aortic valve prosthesis for calcific aortic stenosis: first human case description. *Circulation*. 2002 Dec 10;106(24):3006–8.
132. Rudolph T, Appleby C, Delgado V, Eltchaninoff H, Gebhard C, Hengstenberg C, et al. Patterns of Aortic Valve Replacement in Europe: Adoption by Age. *Cardiology*. 2023 Aug 16;
133. Ando T, Onishi T, Kuno T, Briasoulis A, Takagi H, Grines CL, et al. Transcatheter Versus Surgical Aortic Valve Replacement in the United States (From the Nationwide Readmission Database). *Am J Cardiol*. 2021 Jun 1;148:110–5.
134. Graversen PL, Butt JH, Østergaard L, Jensen AD, Warming PE, Strange JE, et al. Changes in aortic valve replacement procedures in Denmark from 2008 to 2020. *Heart*. 2023 Mar 10;109(7):557–63.
135. Guimaron S, De Brux JL, Verhoye JP, Guihaire J. Surgical aortic valve replacement in the modern era: Insights from the French Registry EPICARD. *J Card Surg*. 2021 Dec;36(12):4573–81.

136. Brown JM, O'Brien SM, Wu C, Sikora JAH, Griffith BP, Gammie JS. Isolated aortic valve replacement in North America comprising 108,687 patients in 10 years: changes in risks, valve types, and outcomes in the Society of Thoracic Surgeons National Database. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Jan;137(1):82–90.
137. Thourani VH, Suri RM, Gunter RL, Sheng S, O'Brien SM, Ailawadi G, et al. Contemporary real-world outcomes of surgical aortic valve replacement in 141,905 low-risk, intermediate-risk, and high-risk patients. *Ann Thorac Surg.* 2015 Jan;99(1):55–61.
138. Glaser N, Persson M, Franco-Cereceda A, Sartipy U. Cause of Death After Surgical Aortic Valve Replacement: SWEDEHEART Observational Study. *J Am Heart Assoc.* 2021 Nov 16;10(22):e022627.
139. Carroll JD, Mack MJ, Vemulapalli S, Herrmann HC, Gleason TG, Hanzel G, et al. STS-ACC TVT Registry of Transcatheter Aortic Valve Replacement. *J Am Coll Cardiol.* 2020 Nov 24;76(21):2492–516.
140. Akins CW, Miller DC, Turina MI, Kouchoukos NT, Blackstone EH, Grunkemeier GL, et al. Guidelines for reporting mortality and morbidity after cardiac valve interventions. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Apr;135(4):732–8.
141. VARC-3 WRITING COMMITTEE, G  n  reux P, Piazza N, Alu MC, Nazif T, Hahn RT, et al. Valve Academic Research Consortium 3: updated endpoint definitions for aortic valve clinical research. *Eur Heart J.* 2021 May 14;42(19):1825–57.
142. Bourguignon T, El Khoury R, Candolfi P, Loardi C, Mirza A, Boulanger-Lothion J, et al. Very Long-Term Outcomes of the Carpentier-Edwards Perimount Aortic Valve in Patients Aged 60 or Younger. *Ann Thorac Surg.* 2015 Sep;100(3):853–9.

143. Bourguignon T, Espitalier F, Pantaleon C, Vermes E, El-Arid JM, Loardi C, et al. Bioprosthetic mitral valve replacement in patients aged 65 years or younger: long-term outcomes with the Carpentier-Edwards PERIMOUNT pericardial valve. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2018 Aug 1;54(2):302–9.
144. Health C for D and R. Abbott Trifecta Valves: Potential Risk of Early Structural Valve Deterioration - Letter to Health Care Providers. FDA [Internet]. 2023 Jul 28 [cited 2023 Oct 10]; Available from: <https://www.fda.gov/medical-devices/letters-health-care-providers/abbott-trifecta-valves-potential-risk-early-structural-valve-deterioration-letter-health-care>
145. Schoen FJ, Levy RJ. Calcification of tissue heart valve substitutes: progress toward understanding and prevention. *Ann Thorac Surg*. 2005 Mar;79(3):1072–80.
146. Kostyunin A, Mukhamadiyarov R, Glushkova T, Bogdanov L, Shishkova D, Osyayev N, et al. Ultrastructural Pathology of Atherosclerosis, Calcific Aortic Valve Disease, and Bioprosthetic Heart Valve Degeneration: Commonalities and Differences. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 9;21(20):7434.
147. Konakci KZ, Bohle B, Blumer R, Hoetzenecker W, Roth G, Moser B, et al. Alpha-Gal on bioprostheses: xenograft immune response in cardiac surgery. *Eur J Clin Invest*. 2005 Jan;35(1):17–23.
148. Naso F, Gandaglia A, Bottio T, Tarzia V, Nottle MB, d'Apice AJF, et al. First quantification of alpha-Gal epitope in current glutaraldehyde-fixed heart valve bioprostheses. *Xenotransplantation*. 2013;20(4):252–61.

149. Reuven EM, Leviatan Ben-Arye S, Marshanski T, Breimer ME, Yu H, FellaH-Hebia I, et al. Characterization of immunogenic Neu5Gc in bioprosthetic heart valves. *Xenotransplantation*. 2016 Sep;23(5):381–92.
150. Helder MRK, Stoyles NJ, Tefft BJ, Hennessy RS, Hennessy RRC, Dyer R, et al. Xenoantigenicity of porcine decellularized valves. *J Cardiothorac Surg*. 2017 Jul 17;12(1):56.
151. Collins BH, Cotterell AH, McCurry KR, Alvarado CG, Magee JC, Parker W, et al. Cardiac xenografts between primate species provide evidence for the importance of the alpha-galactosyl determinant in hyperacute rejection. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5500–10.
152. Senage T, Paul A, Le Tourneau T, FellaH-Hebia I, Vadori M, Bashir S, et al. The role of antibody responses against glycans in bioprosthetic heart valve calcification and deterioration. *Nat Med*. 2022 Feb;28(2):283–94.
153. Veraar C, Koschutnik M, Nitsche C, Laggner M, Polak D, Bohle B, et al. Inflammatory immune response in recipients of transcatheter aortic valves. *JTCVS Open*. 2021 Jun;6:85–96.
154. McGregor CGA, Carpentier A, Lila N, Logan JS, Byrne GW. Cardiac xenotransplantation technology provides materials for improved bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Jan;141(1):269–75.
155. Schussler O, Lila N, Perneger T, Mootoosamy P, Grau J, Francois A, et al. Recipients with blood group A associated with longer survival rates in cardiac valvular bioprostheses. *EBioMedicine*. 2019 Apr;42:54–63.
156. Persson M, Edgren G, Dalén M, Glaser N, Olsson ML, Franco-Cereceda A, et al. ABO blood type and risk of porcine bioprosthetic aortic valve degeneration: SWEDHEART observational cohort study. *BMJ Open*. 2019 May 5;9(5):e029109.

157. Dutta P, James JF, Kazik H, Lincoln J. Genetic and Developmental Contributors to Aortic Stenosis. *Circ Res*. 2021 Apr 30;128(9):1330–43.
158. Dutta P, Lincoln J. Calcific Aortic Valve Disease: a Developmental Biology Perspective. *Curr Cardiol Rep*. 2018 Mar 8;20(4):21.
159. Drolet MC, Roussel E, Deshaies Y, Couet J, Arsenault M. A high fat/high carbohydrate diet induces aortic valve disease in C57BL/6J mice. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Feb 21;47(4):850–5.
160. Weiss RM, Ohashi M, Miller JD, Young SG, Heistad DD. Calcific aortic valve stenosis in old hypercholesterolemic mice. *Circulation*. 2006 Nov 7;114(19):2065–9.
161. Le Quang K, Bouchareb R, Lachance D, Laplante MA, El Hussein D, Boulanger MC, et al. Early development of calcific aortic valve disease and left ventricular hypertrophy in a mouse model of combined dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Oct;34(10):2283–91.
162. Daugherty A, Rateri DL. Development of experimental designs for atherosclerosis studies in mice. *Methods*. 2005 Jun;36(2):129–38.
163. Zeadin M, Butcher M, Werstuck G, Khan M, Yee CK, Shaughnessy SG. Effect of leptin on vascular calcification in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Dec;29(12):2069–75.
164. Nigam V, Srivastava D. Notch1 represses osteogenic pathways in aortic valve cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2009 Dec;47(6):828–34.

165. Tkatchenko TV, Moreno-Rodriguez RA, Conway SJ, Molkentin JD, Markwald RR, Tkatchenko AV. Lack of periostin leads to suppression of Notch1 signaling and calcific aortic valve disease. *Physiol Genomics*. 2009 Nov 6;39(3):160–8.
166. Lee TC, Zhao YD, Courtman DW, Stewart DJ. Abnormal aortic valve development in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2000 May 23;101(20):2345–8.
167. Shi W, Wang X, Shih DM, Laubach VE, Navab M, Lusis AJ. Paradoxical reduction of fatty streak formation in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2078–82.
168. Laforest B, Andelfinger G, Nemer M. Loss of Gata5 in mice leads to bicuspid aortic valve. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2876–87.
169. Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, Narumi T, Kadowaki S, Honda Y, et al. A novel mouse model of aortic valve stenosis induced by direct wire injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Feb;34(2):270–8.
170. Shuvy M, Abedat S, Beerli R, Danenberg HD, Planer D, Ben-Dov IZ, et al. Uraemic hyperparathyroidism causes a reversible inflammatory process of aortic valve calcification in rats. *Cardiovasc Res*. 2008 Aug 1;79(3):492–9.
171. Roosens B, Bala G, Gillis K, Remory I, Droogmans S, Somja J, et al. Echocardiographic integrated backscatter for detecting progression and regression of aortic valve calcifications in rats. *Cardiovasc Ultrasound*. 2013 Jan 26;11:4.
172. Roosens B, Droogmans S, Hostens J, Somja J, Delvenne E, Hernot S, et al. Integrated backscatter for the in vivo quantification of supraphysiological vitamin D(3)-induced cardiovascular calcifications in rats. *Cardiovasc Toxicol*. 2011 Sep;11(3):244–52.

173. Meyer SR, Chiu B, Churchill TA, Zhu L, Lakey JRT, Ross DB. Comparison of aortic valve allograft decellularization techniques in the rat. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;79A(2):254–62.
174. Hinton RB, Alfieri CM, Witt SA, Glascock BJ, Khoury PR, Benson DW, et al. Mouse heart valve structure and function: echocardiographic and morphometric analyses from the fetus through the aged adult. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2008 Jun;294(6):H2480–8.
175. Cimini M, Boughner DR, Ronald JA, Aldington L, Rogers KA. Development of aortic valve sclerosis in a rabbit model of atherosclerosis: an immunohistochemical and histological study. *J Heart Valve Dis*. 2005 May;14(3):365–75.
176. Hinton RB, Lincoln J, Deutsch GH, Osinska H, Manning PB, Benson DW, et al. Extracellular Matrix Remodeling and Organization in Developing and Diseased Aortic Valves. *Circulation Research*. 2006 Jun 9;98(11):1431–8.
177. Sider KL, Zhu C, Kwong AV, Mirzaei Z, de Langé CFM, Simmons CA. Evaluation of a porcine model of early aortic valve sclerosis. *Cardiovascular Pathology*. 2014 Sep 1;23(5):289–97.
178. Marion L, Haugen E, Mjör IA. Methodological assessments of subcutaneous implantation techniques. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1980;14(4):343–57.
179. Fishbein MC, Levy RJ, Ferrans VJ, Dearden LC, Nashef A, Goodman AP, et al. Calcifications of cardiac valve bioprostheses. Biochemical, histologic, and ultrastructural observations in a subcutaneous implantation model system. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1982 Apr;83(4):602–9.

180. Lee S, Kim DH, Youn YN, Joo HC, Yoo KJ, Lee SH. Rosuvastatin attenuates bioprosthetic heart valve calcification. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2019 Sep;158(3):731-741.e1.
181. Richez U, De Castilla H, Guerin CL, Gendron N, Luraghi G, Grimme M, et al. Hemocompatibility and safety of the Carmat Total Artificial Heart hybrid membrane. *Heliyon*. 2019 Dec;5(12):e02914.
182. Poitier B, Rancic J, Richez U, Piquet J, El Batti S, Smadja DM. Fibrin deposition on bovine pericardium tissue used for bioprosthetic heart valve drives its calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2023;10:1198020.
183. Levy RJ, Schoen FJ, Levy JT, Nelson AC, Howard SL, Oshry LJ. Biologic determinants of dystrophic calcification and osteocalcin deposition in glutaraldehyde-preserved porcine aortic valve leaflets implanted subcutaneously in rats. *Am J Pathol*. 1983 Nov;113(2):143–55.
184. Mako WJ, Vesely I. In vivo and in vitro models of calcification in porcine aortic valve cusps. *J Heart Valve Dis*. 1997 May;6(3):316–23.
185. Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Sebo TC, Niekrasz M, McConnell JP, et al. Atorvastatin inhibits hypercholesterolemia-induced cellular proliferation and bone matrix production in the rabbit aortic valve. *Circulation*. 2002 Jun 4;105(22):2660–5.
186. Drolet MC, Arsenault M, Couet J. Experimental aortic valve stenosis in rabbits. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 2;41(7):1211–7.
187. Marechaux S, Corseaux D, Vincentelli A, Richardson M, Ung A, Susen S, et al. Identification of tissue factor in experimental aortic valve sclerosis. *Cardiovasc Pathol*. 2009;18(2):67–76.

188. Guerraty MA, Grant GR, Karanian JW, Chiesa OA, Pritchard WF, Davies PF. Hypercholesterolemia induces side-specific phenotypic changes and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway activation in swine aortic valve endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Feb;30(2):225–31.
189. Porras AM, Shanmuganayagam D, Meudt JJ, Krueger CG, Hacker TA, Rahko PS, et al. Development of Aortic Valve Disease in Familial Hypercholesterolemic Swine: Implications for Elucidating Disease Etiology. *J Am Heart Assoc.* 2015 Oct 27;4(10):e002254.
190. Brown WM, Jay JL, Gott JP, Pan-Chih null, Dorsey LM, Churchwell A, et al. Placement of aortic valve bioprostheses in sheep via a left thoracotomy. Implantation of stentless porcine heterografts. *ASAIO Trans.* 1991 Sep;37(3):M445-446.
191. Harvey L, Bianco R, Lahti M, Carney J, Zhang L, Robinson N. Carpentier-Edwards aortic pericardial bioprosthetic valve as a valid control in preclinical in vivo ovine studies. *Eur J Pharmacol.* 2015 Jul 15;759:192–9.
192. Herijgers P, Ozaki S, Verbeken E, Van Lommel A, Ràcz R, Zietkiewicz M, et al. Calcification characteristics of porcine stentless valves in juvenile sheep. *Eur J Cardiothorac Surg.* 1999 Feb;15(2):134–42.
193. Ozaki S, Herijgers P, Verbeken E, Van Lommel A, Nishida T, Perek B, et al. The influence of stenting on the behavior of amino-oleic acid-treated, glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves in a sheep model. *J Heart Valve Dis.* 2000 Jul;9(4):552–9; discussion 559-560.
194. Neethling WML, Hodge AJ, Glancy R. Kangaroo versus freestyle stentless bioprostheses in a juvenile sheep model: hemodynamic performance and calcification behavior. *J Card Surg.* 2005 Feb;20(1):29–34.

195. Valente M, Laborde F, Thiene G, Gallix P, Calabrese F, Talenti E, et al. Evaluation of Pericarbon valve prosthesis: in vitro, ultrastructural, and animal studies. *J Card Surg*. 1989 Mar;4(1):79–88.
196. Carpentier SM, Chen L, Shen M, Fornes P, Martinet B, Quintero LJ, et al. Heat treatment mitigates calcification of valvular bioprostheses. *Ann Thorac Surg*. 1998 Dec;66(6 Suppl):S264-266.
197. Lim HG, Kim GB, Jeong S, Kim YJ. Development of a next-generation tissue valve using a glutaraldehyde-fixed porcine aortic valve treated with decellularization, α -galactosidase, space filler, organic solvent and detoxification. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2015 Jul;48(1):104–13.
198. Barnhart GR, Jones M, Ishihara T, Rose DM, Chavez AM, Ferrans VJ. Degeneration and calcification of bioprosthetic cardiac valves. Bioprosthetic tricuspid valve implantation in sheep. *Am J Pathol*. 1982 Jan;106(1):136–9.
199. Pettenazzo E, Thiene G, Gatti AM, Pasquino E, Talenti E, Noera G, et al. Is the tricuspid position suitable for testing replacement bioprosthetic valves in the sheep model? *J Heart Valve Dis*. 2001 Jul;10(4):513–9.
200. Chen W, Schoen FJ, Levy RJ. Mechanism of efficacy of 2-amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde-pretreated porcine bioprosthetic heart valves. *Circulation*. 1994 Jul;90(1):323–9.
201. Chanda J, Kuribayashi R, Abe T. Valved conduit in the descending thoracic aorta in juvenile sheep: a useful, cost-effective model for accelerated calcification study in systemic circulation. *Biomaterials*. 1997 Oct;18(19):1317–21.

202. Neethling WM, van Riet S, van den Heever JJ, Hough J, Hodge AJ. Evaluation of kangaroo aortic valved conduits in a juvenile sheep model: preliminary findings. *J Card Surg.* 2001 Oct;16(5):392–9.
203. Conconi MT, Rocco F, Spinazzi R, Tommasini M, Valfrè C, Busetto R, et al. Biological fate of tissue-engineered porcine valvular conduits xenotransplanted in the sheep thoracic aorta. *Int J Mol Med.* 2004 Dec;14(6):1043–8.
204. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science.* 1993 May 14;260(5110):920–6.
205. Dohmen PM, Costa F da, Lopes SV, Yoshi S, Souza FP da, Vilani R, et al. Results of a decellularized porcine heart valve implanted into the juvenile sheep model. *Heart Surg Forum.* 2005;8(2):E100-104; discussion E104.
206. Quinn RW, Hilbert SL, Bert AA, Drake BW, Bustamante JA, Fenton JE, et al. Performance and morphology of decellularized pulmonary valves implanted in juvenile sheep. *Ann Thorac Surg.* 2011 Jul;92(1):131–7.
207. Ramm R, Goecke T, Theodoridis K, Hoeffler K, Sarikouch S, Findeisen K, et al. Decellularization combined with enzymatic removal of N-linked glycans and residual DNA reduces inflammatory response and improves performance of porcine xenogeneic pulmonary heart valves in an ovine in vivo model. *Xenotransplantation.* 2020 Mar;27(2):e12571.
208. Elkins RC, Goldstein S, Hewitt CW, Walsh SP, Dawson PE, Ollerenshaw JD, et al. Recellularization of heart valve grafts by a process of adaptive remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2001 Oct;13(4 Suppl 1):87–92.

209. Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, Corseaux D, Fouquet O, Calet C, et al. Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Apr;131(4):843–52.
210. Vincentelli A, Wautot F, Juthier F, Fouquet O, Corseaux D, Marechaux S, et al. In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Aug;134(2):424–32.
211. Hennessy RS, Go JL, Hennessy RR, Tefft BJ, Jana S, Stoyles NJ, et al. Recellularization of a novel off-the-shelf valve following xenogenic implantation into the right ventricular outflow tract. *PLoS One*. 2017;12(8):e0181614.
212. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, et al. Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med*. 1985 Oct 3;313(14):837–41.
213. Taylor IM, Wiley MJ, Agur A. Retinoic acid-induced heart malformations in the hamster. *Teratology*. 1980 Apr;21(2):193–7.
214. Ryckebusch L, Wang Z, Bertrand N, Lin SC, Chi X, Schwartz R, et al. Retinoic acid deficiency alters second heart field formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 26;105(8):2913–8.
215. Wiegman PJ, Barry WL, McPherson JA, McNamara CA, Gimple LW, Sanders JM, et al. All-trans-retinoic acid limits restenosis after balloon angioplasty in the focally atherosclerotic rabbit : a favorable effect on vessel remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Jan;20(1):89–95.

216. Herdeg C, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Leitritz M, Blattner A, et al. Effects of local all-trans-retinoic acid delivery on experimental atherosclerosis in the rabbit carotid artery. *Cardiovasc Res*. 2003 Feb;57(2):544–53.
217. Jacobson A, Johansson S, Branting M, Melhus H. Vitamin A differentially regulates RANKL and OPG expression in human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Sep 10;322(1):162–7.
218. Sanda T, Kuwano T, Nakao S, Iida S, Ishida T, Komatsu H, et al. Antimyeloma effects of a novel synthetic retinoid Am80 (Tamibarotene) through inhibition of angiogenesis. *Leukemia*. 2005 Jun;19(6):901–9.
219. Kafienah W, Mistry S, Perry MJ, Politopoulou G, Hollander AP. Pharmacological regulation of adult stem cells: chondrogenesis can be induced using a synthetic inhibitor of the retinoic acid receptor. *Stem Cells*. 2007 Oct;25(10):2460–8.
220. Lind T, Sundqvist A, Hu L, Pejler G, Andersson G, Jacobson A, et al. Vitamin a is a negative regulator of osteoblast mineralization. *PLoS One*. 2013;8(12):e82388.
221. Nallamshetty S, Wang H, Rhee EJ, Kiefer FW, Brown JD, Lotinun S, et al. Deficiency of retinaldehyde dehydrogenase 1 induces BMP2 and increases bone mass in vivo. *PLoS One*. 2013;8(8):e71307.
222. Nallamshetty S, Le PT, Wang H, Issacsohn MJ, Reeder DJ, Rhee EJ, et al. Retinaldehyde dehydrogenase 1 deficiency inhibits PPAR γ -mediated bone loss and marrow adiposity. *Bone*. 2014 Oct;67:281–91.

223. Green AC, Kocovski P, Jovic T, Walia MK, Chandraratna R a. S, Martin TJ, et al. Retinoic acid receptor signalling directly regulates osteoblast and adipocyte differentiation from mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res*. 2017 Jan 1;350(1):284–97.
224. Wilson JG, Warkany J. Aortic-arch and cardiac anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats. *Am J Anat*. 1949 Jul;85(1):113–55.
225. Yasui H, Nakazawa M, Morishima M, Miyagawa-Tomita S, Momma K. Morphological observations on the pathogenetic process of transposition of the great arteries induced by retinoic acid in mice. *Circulation*. 1995 May 1;91(9):2478–86.
226. Gruber PJ, Kubalak SW, Pexieder T, Sucov HM, Evans RM, Chien KR. RXR alpha deficiency confers genetic susceptibility for aortic sac, conotruncal, atrioventricular cushion, and ventricular muscle defects in mice. *J Clin Invest*. 1996 Sep 15;98(6):1332–43.
227. Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dollé P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development*. 2001 Apr;128(7):1019–31.
228. Kligman AM, Fulton JE, Plewig G. Topical vitamin A acid in acne vulgaris. *Arch Dermatol*. 1969 Apr;99(4):469–76.
229. Baldwin HE, Nighland M, Kendall C, Mays DA, Grossman R, Newburger J. 40 years of topical tretinoin use in review. *J Drugs Dermatol*. 2013 Jun 1;12(6):638–42.
230. Weinstein GD, Krueger GG, Lowe NJ, Duvic M, Friedman DJ, Jegasothy BV, et al. Tazarotene gel, a new retinoid, for topical therapy of psoriasis: vehicle-controlled study of safety, efficacy, and duration of therapeutic effect. *J Am Acad Dermatol*. 1997 Jul;37(1):85–92.

231. Bodsworth NJ, Bloch M, Bower M, Donnell D, Yocum R, International Panretin Gel KS Study Group. Phase III vehicle-controlled, multi-centered study of topical alitretinoin gel 0.1% in cutaneous AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(2):77–87.
232. Goldsmith LA, Bolognia JL, Callen JP, Chen SC, Feldman SR, Lim HW, et al. American Academy of Dermatology Consensus Conference on the safe and optimal use of isotretinoin: summary and recommendations. *J Am Acad Dermatol*. 2004 Jun;50(6):900–6.
233. Ruzicka T, Lynde CW, Jemec GBE, Diepgen T, Berth-Jones J, Coenraads PJ, et al. Efficacy and safety of oral alitretinoin (9-cis retinoic acid) in patients with severe chronic hand eczema refractory to topical corticosteroids: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial. *Br J Dermatol*. 2008 Apr;158(4):808–17.
234. Saurat JH. Retinoids and psoriasis: novel issues in retinoid pharmacology and implications for psoriasis treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Sep;41(3 Pt 2):S2-6.
235. Duvic M, Hymes K, Heald P, Breneman D, Martin AG, Myskowski P, et al. Bexarotene is effective and safe for treatment of refractory advanced-stage cutaneous T-cell lymphoma: multinational phase II-III trial results. *J Clin Oncol*. 2001 May 1;19(9):2456–71.
236. Castaigne S, Chomienne C, Daniel MT, Ballerini P, Berger R, Fenaux P, et al. All-trans retinoic acid as a differentiation therapy for acute promyelocytic leukemia. I. Clinical results. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1704–9.
237. Chomienne C, Ballerini P, Balitrand N, Daniel MT, Fenaux P, Castaigne S, et al. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemias. II. In vitro studies: structure-function relationship. *Blood*. 1990 Nov 1;76(9):1710–7.

238. Haute Autorité de Santé [Internet]. [cited 2023 Oct 14]. VESANOID (trétinoïne). Available from: https://www.has-sante.fr/jcms/c_2724034/fr/vesanoid-tretinoine
239. WHOCC - ATC/DDD Index [Internet]. [cited 2023 Oct 15]. Available from: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=L01XF01
240. Fiche info - VESANOID 10 mg, capsule molle - Base de données publique des médicaments [Internet]. [cited 2023 Oct 14]. Available from: <https://base-donnees-publique.medicaments.gouv.fr/extrait.php?specid=65540866>
241. Abaza Y, Kantarjian H, Garcia-Manero G, Estey E, Borthakur G, Jabbour E, et al. Long-term outcome of acute promyelocytic leukemia treated with all-trans-retinoic acid, arsenic trioxide, and gemtuzumab. *Blood*. 2017 Mar 9;129(10):1275–83.
242. Singh C, Yanamandra U, Karunakaran P, Jindal N, Kumar SR, Saini N, et al. Long-term real-world outcomes of patients with acute promyelocytic leukaemia treated with arsenic trioxide and all-trans retinoic acid without chemotherapy-a retrospective, single-centre study. *Br J Haematol*. 2023 Apr;201(2):249–55.
243. Adamson PC, Pitot HC, Balis FM, Rubin J, Murphy RF, Poplack DG. Variability in the oral bioavailability of all-trans-retinoic acid. *J Natl Cancer Inst*. 1993 Jun 16;85(12):993–6.
244. Regazzi MB, Iacona I, Gervasutti C, Lazzarino M, Toma S. Clinical pharmacokinetics of tretinoin. *Clin Pharmacokinet*. 1997 May;32(5):382–402.
245. Huk DJ, Hammond HL, Kegechika H, Lincoln J. Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013 Feb;33(2):285–93.

246. Rogers MA, Chen J, Nallamshetty S, Pham T, Goto S, Muehlschlegel JD, et al. Retinoids Repress Human Cardiovascular Cell Calcification With Evidence for Distinct Selective Retinoid Modulator Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020 Mar;40(3):656–69.
247. David TE, Ropchan GC, Butany JW. Aortic valve replacement with stentless porcine bioprostheses. *J Card Surg.* 1988 Dec;3(4):501–5.
248. Booth C, Korossis SA, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold. *J Heart Valve Dis.* 2002 Jul;11(4):457–62.
249. Sizarov A, de Bakker BS, Klein K, Ohlerth S. Building foundations for transcatheter intervascular anastomoses: 3D anatomy of the great vessels in large experimental animals. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014 Oct;19(4):543–51.
250. Menzies CS, Mitchell GE, Little CO. Metabolism of intravenously and intraruminally administered ¹⁴C-labeled beta-carotene by vitamin A-depleted and normal sheep. *Int Z Vitaminforsch.* 1967;37(4):443–8.
251. Donoghue S, Kronfeld DS, Sklan D. Retinol homeostasis in lambs given low and high intakes of vitamin A. *Br J Nutr.* 1983 Sep;50(2):235–48.
252. Raoofi A, Asadi F, Mardjanmehr SH, Kazempoor R. The effects of hypervitaminosis A in sheep following intramuscular administrations of vitamin A. *Food Chem Toxicol.* 2010 Jan;48(1):193–5.
253. Reichel R, Payne JH, Otter A, Holliman A, Foster AP, Mitchell ESE, et al. Hypervitaminosis A in lambs fed milk replacer. *Vet Rec.* 2012 Nov 3;171(18):448.

254. Biedrzycki LM, Lerner E, Levy RJ, Schoen FJ. Differential calcification of cusps and aortic wall of failed stented porcine bioprosthetic valves. *J Biomed Mater Res.* 1997 Mar 15;34(4):411–5.
255. Hechadi J, Gerber BL, Coche E, Melchior J, Jashari R, Glineur D, et al. Stentless xenografts as an alternative to pulmonary homografts in the Ross operation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2013 Jul;44(1):e32-39.
256. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156–9.
257. Anelli F, Nicoletti R, Borghi AM. Categorization and action: what about object consistence? *Acta Psychol (Amst).* 2010 Feb;133(2):203–11.
258. Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S, Hedegaard M, Gentleman E, Sarathchandra P, et al. Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell ‘calcified’ nodules. *PLoS One.* 2012;7(10):e48154.
259. Decano JL, Iwamoto Y, Goto S, Lee JY, Matamalas JT, Halu A, et al. A disease-driver population within interstitial cells of human calcific aortic valves identified via single-cell and proteomic profiling. *Cell Rep.* 2022 Apr 12;39(2):110685.
260. Iqbal F, Schlotter F, Becker-Greene D, Lupieri A, Goettsch C, Hutcheson JD, et al. Sortilin enhances fibrosis and calcification in aortic valve disease by inducing interstitial cell heterogeneity. *Eur Heart J.* 2023 Mar 7;44(10):885–98.
261. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, et al. Report of the American Diabetes Association’s Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes.* 1996 Feb;45(2):242–56.

262. Fullerton A, Fischer T, Lahti A, Wilhelm KP, Takiwaki H, Serup J. Guidelines for measurement of skin colour and erythema. A report from the Standardization Group of the European Society of Contact Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1996 Jul;35(1):1–10.
263. Mattiasson A, Djurhuus JC, Fonda D, Lose G, Nordling J, Stöhrer M. Standardization of outcome studies in patients with lower urinary tract dysfunction: a report on general principles from the Standardisation Committee of the International Continence Society. *Neurourol Urodyn*. 1998;17(3):249–53.
264. Thomas JD, Badano LP. EACVI-ASE-industry initiative to standardize deformation imaging: a brief update from the co-chairs. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging*. 2013 Nov;14(11):1039–40.
265. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2386–93.
266. Soquet J, Barron DJ, d’Udekem Y. A Review of the Management of Pulmonary Atresia, Ventricular Septal Defect, and Major Aortopulmonary Collateral Arteries. *Ann Thorac Surg*. 2019;108(2):601–12.
267. Benton JA, Kern HB, Anseth KS. Substrate properties influence calcification in valvular interstitial cell culture. *J Heart Valve Dis*. 2008 Nov;17(6):689–99.
268. Goto S, Rogers MA, Blaser MC, Higashi H, Lee LH, Schlotter F, et al. Standardization of Human Calcific Aortic Valve Disease in vitro Modeling Reveals Passage-Dependent Calcification. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:49.

269. Carpentier A, Lemaigre G, Robert L, Carpentier S, Dubost C. Biological factors affecting long-term results of valvular heterografts. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1969 Oct;58(4):467–83.
270. Duran CG, Gunning AJ. A method for placing a total homologous aortic valve in the subcoronary position. *Lancet.* 1962 Sep 8;2(7254):488–9.
271. Jones M, Eidbo EE, Hilbert SL, Ferrans VJ, Clark RE. Anticalcification treatments of bioprosthetic heart valves: in vivo studies in sheep. *J Card Surg.* 1989 Mar;4(1):69–73.
272. Schoen FJ, Collins JJ, Cohn LH. Long-term failure rate and morphologic correlations in porcine bioprosthetic heart valves. *Am J Cardiol.* 1983 Mar 15;51(6):957–64.
273. Levy RJ, Schoen FJ, Howard SL. Mechanism of calcification of porcine bioprosthetic aortic valve cusps: role of T-lymphocytes. *Am J Cardiol.* 1983 Sep 1;52(5):629–31.
274. Schoen FJ, Tsao JW, Levy RJ. Calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. Implications for the mechanisms of bioprosthetic tissue mineralization. *Am J Pathol.* 1986 Apr;123(1):134–45.
275. Golomb G, Schoen FJ, Smith MS, Linden J, Dixon M, Levy RJ. The role of glutaraldehyde-induced cross-links in calcification of bovine pericardium used in cardiac valve bioprostheses. *Am J Pathol.* 1987 Apr;127(1):122–30.
276. Johnston TP, Schoen FJ, Levy RJ. Prevention of calcification of bioprosthetic heart valve leaflets by Ca²⁺ diphosphonate pretreatment. *J Pharm Sci.* 1988 Sep;77(9):740–4.
277. Maranto AR, Schoen FJ. Alkaline phosphatase activity of glutaraldehyde-treated bovine pericardium used in bioprosthetic cardiac valves. *Circ Res.* 1988 Oct;63(4):844–8.

278. Levy RJ, Schoen FJ, Flowers WB, Staelin ST. Initiation of mineralization in bioprosthetic heart valves: studies of alkaline phosphatase activity and its inhibition by AlCl_3 or FeCl_3 preincubations. *J Biomed Mater Res*. 1991 Aug;25(8):905–35.
279. Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Burr LH, Gerein AN, Janusz MT, et al. The Carpentier-Edwards supraannular porcine bioprosthesis. A new generation tissue valve with excellent intermediate clinical performance. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1988 Oct;96(4):652–66.
280. Jamieson WR, Allen P, Miyagishima RT, Gerein AN, Munro AI, Burr LH, et al. The Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis. A first-generation tissue valve with excellent long-term clinical performance. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1990 Mar;99(3):543–61.
281. Jamieson WR, Hayden RI, Miyagishima RT, Tutassaura H, Munro AI, Gerein AN, et al. The Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to 15 years. *J Card Surg*. 1991 Dec;6(4 Suppl):550–6.
282. Jamieson WR, Munro AI, Miyagishima RT, Allen P, Burr LH, Tyers GF. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: clinical performance to seventeen years. *Ann Thorac Surg*. 1995 Oct;60(4):999–1006; discussion 1007.
283. Jamieson WR, Burr LH, Munro AI, Miyagishima RT. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: a 21-year experience. *Ann Thorac Surg*. 1998 Dec;66(6 Suppl):S40-43.
284. Jamieson WRE, Burr LH, Miyagishima RT, Germann E, Macnab JS, Stanford E, et al. Carpentier-Edwards supra-annular aortic porcine bioprosthesis: clinical performance over 20 years. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005 Oct;130(4):994–1000.

285. Herijgers P, Ozaki S, Verbeken E, Van Lommel A, Ràcz R, Zietkiewicz M, et al. Calcification characteristics of porcine stentless valves in juvenile sheep. *Eur J Cardiothorac Surg*. 1999 Feb;15(2):134–42.
286. Flameng W, Jashari R, De Visscher G, Mesure L, Meuris B. Calcification of allograft and stentless xenograft valves for right ventricular outflow tract reconstruction: an experimental study in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2011 Jun;141(6):1513–21.
287. Patel HJ, Herbert MA, Drake DH, Hanson EC, Theurer PF, Bell GF, et al. Aortic valve replacement: using a statewide cardiac surgical database identifies a procedural volume hinge point. *Ann Thorac Surg*. 2013 Nov;96(5):1560–5; discussion 1565-1566.
288. Dewey TM, Herbert MA, Prince SL, Bowers BS. Influence of surgical volume on outcomes in low-risk patients undergoing isolated surgical aortic valve replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2022 Jun;163(6):2046-2052.e2.
289. Welke KF, Karamlou T, O'Brien SM, Dearani JA, Tweddell JS, Kumar SR, et al. Contemporary Relationship Between Hospital Volume and Outcomes in Congenital Heart Surgery. *Ann Thorac Surg*. 2023 Aug 29;S0003-4975(23)00904-9.
290. Jamieson WR, Rosado LJ, Munro AI, Gerein AN, Burr LH, Miyagishima RT, et al. Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: primary tissue failure (structural valve deterioration) by age groups. *Ann Thorac Surg*. 1988 Aug;46(2):155–62.
291. Kutsche LM, Oyer P, Shumway N, Baum D. An important complication of Hancock mitral valve replacement in children. *Circulation*. 1979 Aug;60(2 Pt 2):98–103.
292. Geha AS, Laks H, Stansel HC, Cornhill JF, Kilman JW, Buckley MJ, et al. Late failure of porcine valve heterografts in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1979 Sep;78(3):351–64.

293. Sanders SP, Levy RJ, Freed MD, Norwood WI, Castaneda AR. Use of Hancock porcine xenografts in children and adolescents. *Am J Cardiol*. 1980 Sep;46(3):429–38.
294. Rocchini AP, Weesner KM, Heidelberger K, Keren D, Behrendt D, Rosenthal A. Porcine xenograft valve failure in children: an immunologic response. *Circulation*. 1981 Aug;64(2 Pt 2):II162-171.
295. Dunn JM. Porcine valve durability in children. *Ann Thorac Surg*. 1981 Oct;32(4):357–68.
296. Miller DC, Stinson EB, Oyer PE, Billingham ME, Pitlick PT, Reitz BA, et al. The durability of porcine xenograft valves and conduits in children. *Circulation*. 1982 Aug;66(2 Pt 2):I172-185.
297. Walker WE, Duncan JM, Frazier OH, Livesay JJ, Ott DA, Reul GJ, et al. Early experience with the ionescu-shiley pericardial xenograft valve. Accelerated calcification in children. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1983 Oct;86(4):570–5.
298. Magilligan DJ, Lewis JW, Tilley B, Peterson E. The porcine bioprosthetic valve. Twelve years later. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985 Apr;89(4):499–507.
299. Chen PC, Sager MS, Zurakowski D, Pigula FA, Baird CW, Mayer JE, et al. Younger age and valve oversizing are predictors of structural valve deterioration after pulmonary valve replacement in patients with tetralogy of Fallot. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012 Feb;143(2):352–60.
300. Duran CG, Gunning AJ. HETEROLOGOUS AORTIC-VALVE TRANSPLANTATION IN THE DOG. *Lancet*. 1965 Jul 17;2(7403):114–5.

301. David TE, Pollick C, Bos J. Aortic valve replacement with stentless porcine aortic bioprosthesis. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1990 Jan;99(1):113–8.
302. Bach DS, Kon ND. Long-term clinical outcomes 15 years after aortic valve replacement with the Freestyle stentless aortic bioprosthesis. *Ann Thorac Surg.* 2014 Feb;97(2):544–51.
303. Juthier F, Vincentelli A, Hysi I, Pinçon C, Rousse N, Banfi C, et al. Stentless porcine bioprosthesis in pulmonary position after ross procedure: midterm results. *Ann Thorac Surg.* 2015 Apr;99(4):1255–9.
304. O’Brien SM, Clarke DR, Jacobs JP, Jacobs ML, Lacour-Gayet FG, Pizarro C, et al. An empirically based tool for analyzing mortality associated with congenital heart surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009 Nov;138(5):1139–53.
305. Ozaki S, Herijgers P, Flameng W. A new model to test the calcification characteristics of bioprosthetic heart valves. *Ann Thorac Cardiovasc Surg.* 2004 Feb;10(1):23–8.
306. Hennekens CH, Buring JE, Manson JE, Stampfer M, Rosner B, Cook NR, et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996 May 2;334(18):1145–9.
307. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, et al. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 1996 May 2;334(18):1150–5.
308. Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. Beta-carotene supplementation and incidence of cancer and cardiovascular disease: the Women’s Health Study. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Dec 15;91(24):2102–6.

309. Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, et al. A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med*. 2007 Aug 13;167(15):1610–8.
310. Kulik A, Masters RG, Bédard P, Hendry PJ, Lam BK, Rubens FD, et al. Postoperative lipid-lowering therapy and bioprosthesis structural valve deterioration: justification for a randomised trial? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2010 Jan;37(1):139–44.
311. Gilmanov D, Bevilacqua S, Mazzone A, Glauber M. Do statins slow the process of calcification of aortic tissue valves? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2010 Sep;11(3):297–301.
312. Chacko J, Harling L, Ashrafian H, Athanasiou T. Can statins improve outcomes after isolated cardiac valve surgery? A systematic literature review. *Clin Cardiol*. 2013 Aug;36(8):448–55.
313. Costa GF, Costa M, Gonçalves L, Teixeira R. Antiplatelet therapy after transcatheter aortic valve implantation: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2021 Nov 2;60(5):1022–9.
314. Navarese EP, Grisafi L, Spinoni EG, Mennuni MG, Rognoni A, Ratajczak J, et al. Safety and Efficacy of Different Antithrombotic Strategies after Transcatheter Aortic Valve Implantation: A Network Meta-Analysis. *Thromb Haemost*. 2022 Feb;122(2):216–25.
315. Guedeney P, Roule V, Mesnier J, Chapelle C, Portal JJ, Laporte S, et al. Antithrombotic therapy and cardiovascular outcomes after transcatheter aortic valve implantation in patients without indications for chronic oral anticoagulation: a systematic review and network meta-

analysis of randomized controlled trials. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*. 2023 Apr 10;9(3):251–61.

316. Jochheim D, Barbanti M, Capretti G, Stefanini GG, Hapfelmeier A, Zadrozny M, et al. Oral Anticoagulant Type and Outcomes After Transcatheter Aortic Valve Replacement. *JACC Cardiovasc Interv*. 2019 Aug 26;12(16):1566–76.

317. Ueyama H, Kuno T, Ando T, Briasoulis A, Fox J, Hayashida K, et al. Meta-analysis Comparing Direct Oral Anticoagulants Versus Vitamin K Antagonists After Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Am J Cardiol*. 2020 Apr 1;125(7):1102–7.

318. Lancellotti P, Aqil A, Musumeci L, Jacques N, Ditkowski B, Debusson M, et al. Bioactive surface coating for preventing mechanical heart valve thrombosis. *J Thromb Haemost*. 2023 Sep;21(9):2485–98.

ANNEXES

Annexe 1 : Brevet international WO 2021/064072 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve

Annexe 2 : Brevet américain US 2022/0339322 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve

Annexe 3 : Protocole de rinçage et de conservation de la racine aortique porcine avant implantation chez l'agneau

Annexe 4 : Page du projet RETINAVS sur le site internet de l'Agence Nationale de la Recherche

Annexe 5 : Communication au congrès de l'European Society for Surgical Research (ESSR) : programme et présentation PowerPoint

Annexe 1 : Brevet international WO 2021/064072 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve



(51) International Patent Classification:

A61K 31/203 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/EP2020/077456

(22) International Filing Date:

01 October 2020 (01.10.2020)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

19306256.9 02 October 2019 (02.10.2019) EP

(71) **Applicants:** INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, 75013 Paris (FR). **INSTITUT PASTEUR DE LILLE** [FR/FR]; 1, rue du Professeur Calmette, 59000 LILLE (FR). **UNIVERSITÉ DE LILLE** [FR/FR]; 42 rue Paul Duez, 59800 Lille (FR). **CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE** [FR/FR]; 2 avenue Oscar Lambert, 59000 LILLE (FR).

(72) **Inventors:** **SUSEN, Sophie**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR). **CORSEAU, Delphine**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR). **SOTTEJEAU, Yoann**; INSERM UMR 1011, Laboratoires J et K, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59045 LILLE Cedex (FR). **ROSA, Mickael**; INSERM UMR 1011, Laboratoires J et K, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59045 LILLE Cedex (FR). **SOQUET, Jérôme**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR). **VAN BELLE, Eric**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR). **STAELS, Bart**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR). **DUPONT, Annabelle**; INSERM UMR 1011, INSTITUT PASTEUR, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 LILLE Cedex (FR).

(74) **Agent:** INSERM TRANSFERT; 7 rue Watt, 75013 Paris (FR).

(81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) **Title:** USE OF RETINOIC ACID RECEPTOR (RAR) AGONISTS FOR REVERSING, PREVENTING, OR DELAYING CALCIFICATION OF AORTIC VALVE

(57) **Abstract:** Aortic valve calcification is a condition in which calcium deposits form on the aortic valve in the heart. These deposits can cause narrowing at the opening of the aortic valve. This narrowing can become severe enough to reduce blood flow through the aortic valve - a condition called aortic valve stenosis. The inventors have shown that retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype in valvular interstitial cells (VICs). More particularly, RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like phenotype in VIC. On the contrary, ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC. Thus the results prompt to consider that use of retinoic acid receptor (RAR) agonists would be suitable for the reversing, preventing or delaying calcification of the aortic valve.



USE OF RETINOIC ACID RECEPTOR (RAR) AGONISTS FOR REVERSING, PREVENTING, OR DELAYING CALCIFICATION OF AORTIC VALVE

5 **FIELD OF THE INVENTION:**

The present invention is in the field of medicine and in particular in cardiology.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

10 Aortic valve calcification is a condition in which calcium deposits form on the aortic valve in the heart. These deposits can cause narrowing at the opening of the aortic valve. This narrowing can become severe enough to reduce blood flow through the aortic valve - a condition called aortic valve stenosis.

15 In particular, calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common valvular heart disease in adults, affecting 2–6% of people over 65 years [1]. First described as a passive, degenerative process related to repetitive high mechanical stress, it is now clear that CAVD is an atherosclerosis-like disease mediated by lipid deposition, inflammation, fibrosis and calcification [2, 3]. The symptoms of CAVD vary depending on the degree of valve stenosis. Patients with mild to moderate CAVD may lack symptoms as symptoms typically appear in those patients with severe CAVD. Symptoms can include progressive shortness of breath on
20 exertion, syncope, chest pain, and sudden death. Effective treatments are represented by valve replacement either by transcatheter aortic valve implantation (TAVI) or by surgical aortic valve replacement. In recent time, the use of bioprosthetic valves (BPVs) vs mechanic valves for treating AVS with TAVI has considerably increased. The primary cause of long-term failure of BPV is structural valve deterioration due to tissue calcification. Recent studies have reported
25 similarities between histological findings in stenosed AV and explanted degenerated BPV. So far, no targeted medical therapy is proven to prevent, slow down or treat fibrocalcific AVS or to prevent BPV degeneration.

30 Valvular interstitial cells (VICs) are the most prevalent cells found in human aortic valves and play a major role in tissue homeostasis and valve function [4]. These cells represent a heterogeneous and dynamic cell population composed of progenitor cells, quiescent cells, activated cells and osteoblast-like cells [5]. Recent studies have suggested that this latter cell phenotype plays an important role in valve calcification, a hallmark of CAVD [3, 6]. A better understanding of VIC biology, major component of aortic valve and effectors of valve fibrocalcification, may provide therapeutic targets for prevent, slow or stop fibrocalcification

progression. Retinoic pathway has documented effects on inflammatory, fibrotic, angiogenesis and calcifying processes in other cells than VIC. For example, retinoid acid, the bioactive metabolic of vitamin A, inhibits osteoblastic mineralization (Lind, 2013) and reduces the expression of osteoprotegerin through activation of retinoid acid receptors in osteoblasts (Jacobson, 2004). Interestingly, retinoid acid is a negative regulator of osteoblast differentiation and inhibits calcifications in mesenchymal progenitor cells which have same properties than VIC to differentiate (Green, 2017). Today there are few data on the role of retinoids and associated nuclear receptors on CAVD. To our knowledge, the only published experimental data on the potential role of retinoids on aortic valve calcification suggests that an excess of vitamin A dietary intake could promote heart valve calcification (Huk DJ, Hammond HL, Kegechika H, Lincoln J. Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification in vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2013 Feb;33(2):285-93).

SUMMARY OF THE INVENTION:

As defined by the claims, the present invention relates to the use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The first object of the present invention relates to a method of reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a retinoic acid receptor (RAR) agonist.

As used herein, the term “valve” may refer to the valve that prevent the backflow of blood during the rhythmic contractions. There are four main heart valves. In particular, the aortic valve separates the left ventricle and aorta. The term “aortic valve” includes a diseased aortic valve or a bioprosthetic valve.

As used herein, the term “bioprosthetic valve” is a stented tissue heart valve and may refer to a device used to replace or supplement an aortic valve that is defective, malfunctioning, or missing. Examples of bioprosthetic valve prostheses include, but are not limited to, TS 3fs® Aortic Bioprosthesis, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Mitral Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Plus Mitral Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Theon Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Theon Mitral Replacement System, Carpentier-Edwards Aortic Porcine Bioprosthesis, Carpentier-Edwards

Duraflex Low Pressure Porcine Mitral Bioprosthesis, Carpentier-Edwards Duraflex mitral bioprosthesis (porcine), Carpentier-Edwards Mitral Porcine Bioprosthesis, Carpentier-Edwards S.A.V. Aortic Porcine Bioprosthesis, Edwards Prima Plus Stentless Bioprosthesis, Edwards Sapien Transcatheter Heart Valve, Medtronic, Freestyle® Aortic Root Bioprosthesis, Hancock® II Stented Bioprosthesis, Hancock II Ultra® Bioprosthesis, Mosaic® Bioprosthetic, Mosaic Ultra® Bioprosthesis, St. Jude Medical, Biocor®, Biocor™ Supra, Biocor® Pericardia, Biocor™ Stentless, Epic™, Epic Supra™, Toronto Stentless Porcine Valve (SPV®), Toronto SPV II®, Trifecta, Sorin Group, Mitroflow Aortic Pericardial Valve®, Cryolife, Cryolife aortic Valve®, Cryolife pulmonic Valve®, Cryolife-O'Brien stentless aortic xenograft Valve® and all variations thereof. Generally, bioprosthetic valve comprise a tissue valve having one or more cusps and the valve is mounted on a frame or stent, both of which are typically elastical. As used herein, the term “elastical” means that the device is capable of flexing, collapsing, expanding, or a combination thereof. The cusps of the valve are generally made from tissue of mammals such as, without limitation, pigs (porcine), cows (bovine), horses, sheep, goats, monkeys, and humans.

As used herein, the expression “calcification of the aortic valve” has its general meaning in the art and refers to formation, growth or deposition of extracellular matrix hydroxyapatite (calcium phosphate) crystal deposits in the aortic valve, including a bioprosthetic valve.

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for primary prevention of calcification. In particular, the method of the present invention is suitable for the treatment of calcific aortic valve disease. As used herein, the term “calcific aortic valve disease” or “CAVD” has its general meaning in the art and refers to a slowly progressive disorder with a disease continuum that ranges from mild valve thickening without obstruction of blood flow, termed aortic sclerosis, to severe calcification with impaired leaflet motion, or aortic stenosis. Thus disease progression is generally characterized by a process of thickening of the valve leaflets and the formation of calcium nodules—often including the formation of actual bone—and new blood vessels, which are concentrated near the aortic surface. End-stage disease, e.g., calcific aortic stenosis, is generally characterized pathologically by large nodular calcific masses within the aortic cusps that protrude along the aortic surface into the sinuses of Valsalva, interfering with opening of the cusps. In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for the treatment of calcific aortic stenosis.

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for secondary prevention of calcification. In particular, the method of the present invention is particularly suitable for preventing degeneration of an implanted bioprosthetic valve. Thus in

some embodiment, the method of the present invention is particularly suitable for delaying or preventing the calcification of a bioprosthetic valve after valve replacement either surgically or after transcatheter aortic valve implantation (TAVI).

As used herein, the term "treatment" or "treat" refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By "therapeutic regimen" is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase "induction regimen" or "induction period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a patient during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a "loading regimen", which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase "maintenance regimen" or "maintenance period" refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a patient during treatment of an illness, e.g., to keep the patient in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

In some aspects, the method of the present invention is particularly suitable for preventing stenosis. As used herein, the term "stenosis" refers to the narrowing of the aortic valve that could block or obstruct blood flow from the heart and cause a back-up of flow and pressure in the heart.

As used herein, the term "retinoic acid receptor" or "RAR" has its general meaning in the art and refers to a type of nuclear receptor which can also act as a transcription factor that

is activated by both all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid. There are three retinoic acid receptors (RAR), RAR α , RAR β and RAR γ , encoded by the *RARA*, *RARB*, *RARG* genes, respectively. Each receptor isoform has ten splice variants: four for alpha, four for beta, and two for gamma. RAR receptors activate transcription by binding to DNA sequence elements, known as RAR response elements (RARE), in the form of a heterodimer with retinoid X receptors (known as RXRs).

As used herein, the term "retinoic acid receptor (RAR) agonist" is intended to mean those compounds recognized in the art as those capable of acting through retinoic acid receptors and are efficient at inducing RARE-dependent gene expression. Preferably, the RAR agonist is a RAR α agonist. The prior art contains a large number of chemical compounds that are RAR agonists. Among the prior art documents, mention may, for example, be made of patent EP 0 816 352 B1 which describes aromatic biaryl heterocyclic compounds for the treatment of dermatological, rheumatic, respiratory and ophthalmological conditions, but also for cosmetic uses, document WO 2005/056510 which describes molecules comprising an aromatic ring substituted with a hydroxyalkyl radical, documents WO 99/10308 and WO 2006/066978 which describe substituted biphenyl derivatives, documents U.S. Pat. No. 6,218,128 and EP 0879814 which describe bicyclic and/or tricyclic compounds, document EP 0850909 which describes stilbene compounds, document WO 98/56783 which describes biaromatic compounds, and documents EP 0776885 and EP 0776881 which describe biaromatic compounds comprising adamantyl groups. The RAR agonist selectivity of a compound can be determined by routine ligand binding assays known to one of skill in the art such as described in C. Apfel et al., Proc. Nat. Sci. Acad. (USA), 89: 7129-7133 (1992); M. Teng et al., J. Med. Chem., 40: 2445-2451 (1997); and PCT Publication WO 96/30009. For instance known RAR α agonists include but are not limited to: TTNPB, tamibarotene, 9-cis-retinoic acid, trans-retinoic acid, AGN193836, Ro 40-6055, CD666, and BMS753. In some embodiments, the RAR α agonist is 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)amino]carbonyl]benzoic acid (AM80).

By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the agonist of the present invention for the treatment of the aortic valve stenosis at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the compound will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or

coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

Typically, the agonist of the present invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. The agonist of the present invention can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example,

glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

The present invention also relates to the use of a RAR agonist of the present invention for the preparation of bioprosthetic valve. In this respect, the invention relates more particularly to bioprosthetic valve comprising an amount of a RAR agonist. Such a local biomaterial or medical delivery device can be used to treat aortic valve stenosis. Such biomaterial or medical delivery device may be biodegradable. The agonist of the invention is preferably entrapped into the cusps of the valve. The cusps of the valve are generally made from tissue of mammals such as, without limitation, pigs (porcine), cows (bovine), horses, sheep, goats, monkeys, and humans. With said entrapment, it is possible to achieve a high level of local action. According to the present invention, the valve may be a collapsible elastical valve having one or more cusps and the collapsible elastical valve may be mounted on an elastical stent. In some embodiments, the collapsible elastical valve may comprise one or more cusps of biological origin. In some embodiments, the one or more cusps are porcine, bovine, or human. The elastical stent portion of the valve prosthesis used in the present invention may be self-expandable or expandable by way of a balloon catheter. The elastical stent may comprise any biocompatible material known to those of ordinary skill in the art. Examples of biocompatible materials include, but are not limited to, ceramics; polymers; stainless steel; titanium; nickel-titanium alloy, such as nitinol; tantalum; alloys containing cobalt, such as Elgiloy® and Phynox®; and the like. The process of disposing the coating composition which comprises the RAR agonist of the present invention may be any process known in the art. The local delivery according to the present invention allows for high concentration of the agonist of the present invention at the disease site with low concentration of circulating compound. For purposes of the invention, a therapeutically effective amount will be administered.

The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES:

Figure 1: Retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype

A: Calcification ratio of VIC treated with retinoic acid (1; 10; 100 or 1000 nM) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. **B** RUNX2 and relative mRNA expression in VIC treated with retinoic acid (1; 10; 100 or 1000 nM) in pro-

calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are presented as mean+SEM, * : $p < 0.05$

Figure 2: Retinoids reduce calcification and osteoblast-like phenotype in a RAR activation dependent manner

5 **A:** Calcification ratio of VIC treated with retinoic acid, Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist) or SR11237 (RXR agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. **B and C:** RUNX2 and MSX2 relative mRNA expression in VIC treated with retinoic acid, Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist) or SR11237 (RXR agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are
10 presented as mean+SEM, * : $p < 0.05$

Figure 3: RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like phenotype in VIC

15 **A:** Calcification ratio of VIC treated with Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist), AM80 (RAR α agonist), CD2314 (RAR β agonist) or CD437 (RAR γ agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. **B and C:** RUNX2 and MSX2 relative mRNA expression in VIC treated with Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist), AM80 (RAR α agonist), CD2314 (RAR β agonist) or CD437 (RAR γ agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are presented as mean+SEM, * : $p < 0.05$

20 **Figure 4: ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC**

25 **A:** Calcification ratio of VIC treated with 4-Diethylaminobenzaldehyde 25 or 50 nM, (DEAB, ALDH inhibitor) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. **B:** RUNX2 relative mRNA expression in VIC treated with DEAB in procalcifying medium for 7 days.

EXAMPLE:

Methods

Modulation of retinoic acid signaling in pro-calcifying conditions

30 VIC were treated for 7 days in a medium composed of DMEM with 10% FBS, supplemented with ascorbic acid (283 μ M, Sigma Aldrich), Sodium Phosphate (3 mM, Sigma Aldrich) and dexamethasone (100 nM, Stem Cell technologies). VIC were treated with retinoic acid (RA: 1; 10; 100; 1000 nM), TTNPB (RAR pan agonist, 1 μ M), AM80 (RAR α specific

agonist, 1 μ M), CD2314 (RAR β specific agonist, 1 μ M), CD437 (RAR γ specific agonist, 1 μ M) or 4-Diethylaminobenzaldehyde (DEAB, ALDH inhibitor, 25, 50 nM).

Calcification measurement

5 After 7 days of treatment, VIC were rinsed twice in PBS then fixed in paraformaldehyde 4% for 15 minutes. After washing with deionized water, calcium deposits were stained with an alizarin red solution (1%, pH 6.38) for 10 minutes. Then, cells were washed with deionized water and staining was fixed with absolute ethanol. Quantification is performed according to Gregory et al method. Briefly, cells were incubated with acetic acid 10% for 30 minutes under
10 smooth shaking. Cells were then transferred to a microtube and vortexed for 30 seconds. Mineral oil was added to each tube and samples were heated for 10 minutes à 85°C and cooled in ice for 5 minutes. After centrifugation (15 minutes, 16.000 g), supernatants are collected and 200 μ l of ammonium hydroxide are added. Samples are then read at 405 nm in a microplate.

15 Quantitative PCR

RNA was extracted from VICs after homogenization in TRIzol reagent (Life Technologies), following the Chomczynski and Sacchi protocol. For gene expression analysis, 2 micrograms of total extracted RNA were reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) in a total volume of 20 μ l, according to
20 manufacturer's procedures. Samples were incubated at 25 °C for 10 min, followed by 2 h at 37 °C. The obtained cDNA were stored at -20 °C. Quantitative PCR was performed using an ABI PRISM 7000 Detection System (Life Technologies). Four microliters of reverse transcription product were added to 16 μ l of a mix consisting of 10 μ l of master mix containing Taq polymerase, MgCl₂, and dNTPs (Life Technologies), 1 μ l solution containing sense and
25 antisense primers and TaqMan® probe specific for the gene of interest and 5 μ l of water. The expressions of the transcripts were normalized by Abelson (ABL) mRNA expression, used as an endogenous reference gene. The relative quantification of the transcripts was performed using the cycle threshold (Ct) comparative method and calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. For each sample, detection of PCR products was performed separately and in duplicate. ABL
30 (Hs01104728_m1), RUNX2 (Hs00231692_m1) and MSX2 (Hs00741177_m1) commercial assays were purchased from Life Technologies.

Statistical analyses

All data are reported as mean $\pm$ SEM. A Student t-test for continuous variables were used. For all analysis, a p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Illinois).

5 **Results**

The results are depicted in Figures 1-4. Figures 1A and 1B show that retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype. Figures 2A-2C show that retinoids reduce calcification and osteoblast-like phenotype in a RAR activation dependent manner. Moreover, figures 3A-3C show that: RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like
10 phenotype in VIC. Finally, figures 4A and 4B show that ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this
15 invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

1. Nishimura RA, Otto CM, Bonow RO et al (2014) 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. J Am Coll Cardiol
20 63(22):e57–185. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.536

2. Yetkin E, Waltenberger J (2009) Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. Int J Cardiol 135(1):4–13. doi:10.1016/j.ijcard.2009.03.108

3. Lindman BR, Clavel MA, Mathieu P et al (2016) Calcific aortic stenosis. Nat Rev Dis Primers 2:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6

25 4. Taylor PM, Batten P, Brand NJ, Thomas PS, Yacoub MH (2003) The cardiac valve interstitial cell. Int J Biochem Cell Biol 35(2):113–118

5. Liu AC, Joag VR, Gotlieb AI (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. Am J Pathol 171(5):1407–1418. doi:10.2353/ajpath.2007.070251

30 6. Cloyd KL, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S et al (2012) Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell ‘calcified’ nodules. PLoS ONE. doi:10.1371/journal.pone.0048154

CLAIMS:

1. A method of reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a retinoic acid receptor (RAR) agonist.
- 5 2. The method of claim 1 wherein the valve is a diseased aortic valve.
3. The method of claim 2 wherein the patient suffers from a calcific aortic valve disease.
4. The method of claim 1 wherein the valve is a bioprosthetic valve.
5. The method of claim 4 for preventing degeneration of an implanted bioprosthetic valve.
6. The method of claim 4 for delaying or preventing the calcification of a bioprosthetic
10 valve after valve replacement either surgically or after transcatheter aortic valve implantation (TAVI).
7. The method of claim 1 wherein the RAR agonist is a RAR α agonist.
8. The method of claim 7 wherein the RAR α agonist is selected from the group consisting of TTNPB, tamibarotene, 9-cis-retinoic acid, trans-retinoic acid, AGN193836, Ro 40-
15 6055, CD666, and 4-[[[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)amino]carbonyl]benzoic acid (AM80).
9. Use of a RAR agonist for the preparation of bioprosthetic valve.
10. A bioprosthetic valve comprising an amount of a RAR agonist.
11. The bioprosthetic valve of claim 10 wherein the RAR agonist entrapped into the cusps
20 of the valve.
12. The bioprosthetic valve of claim 10 for the treatment of aortic valve stenosis.

1/5

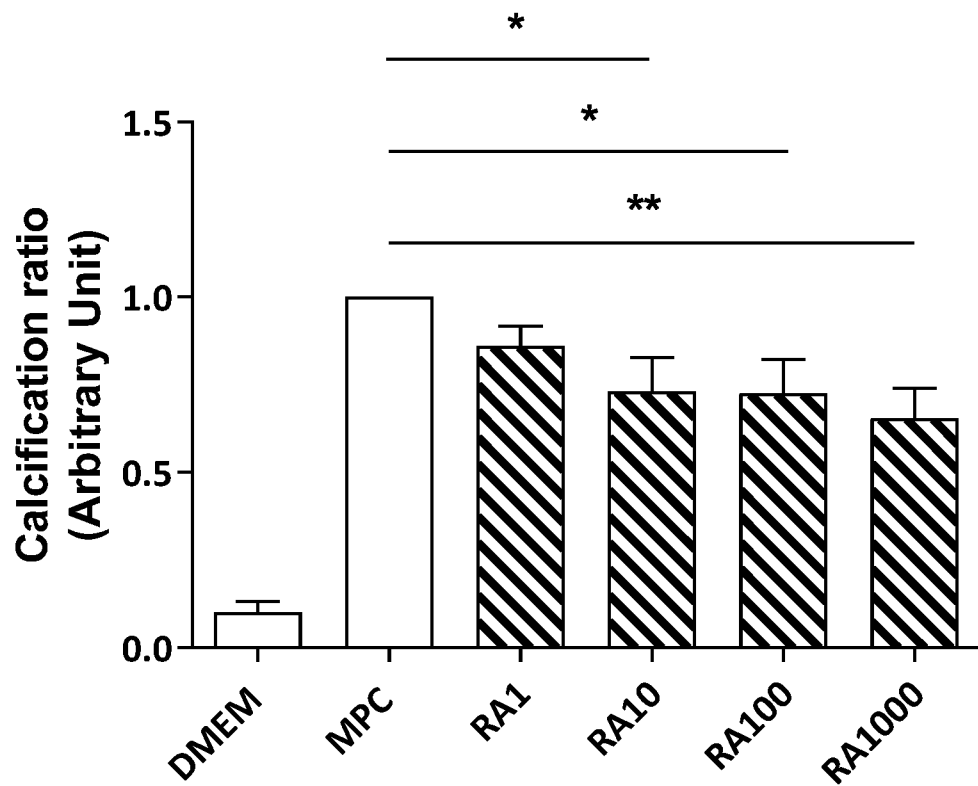


Figure 1A

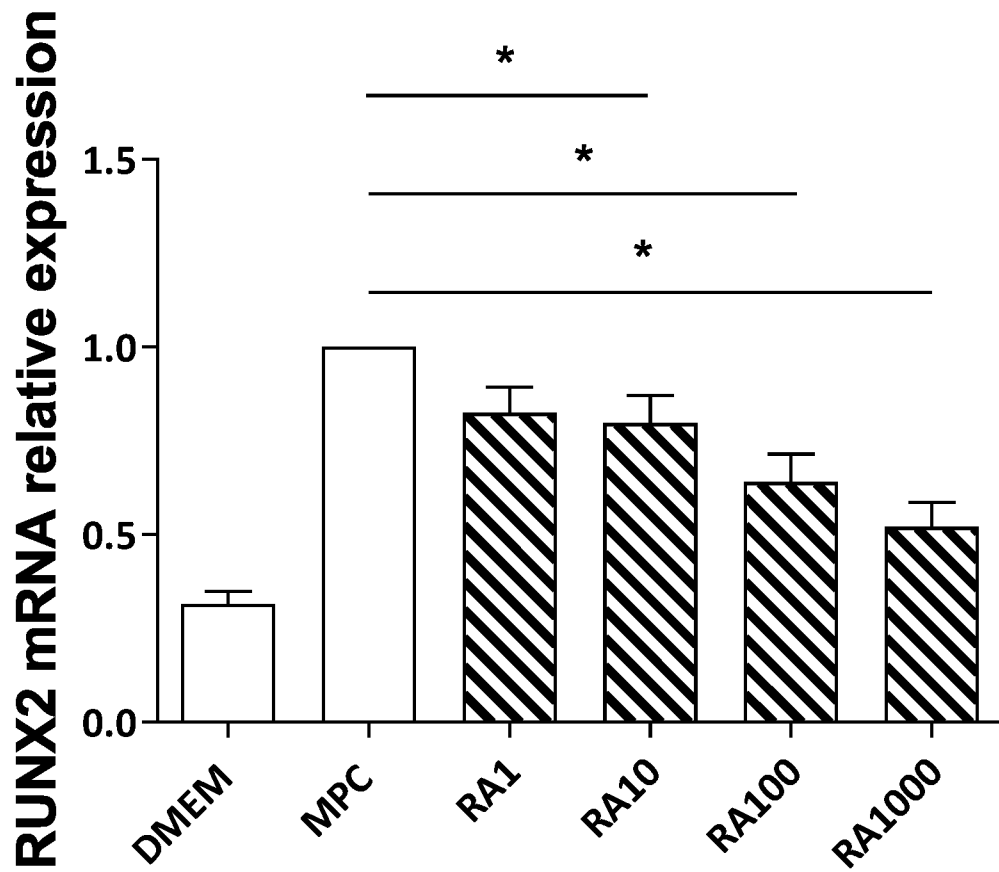


Figure 1B

2/5

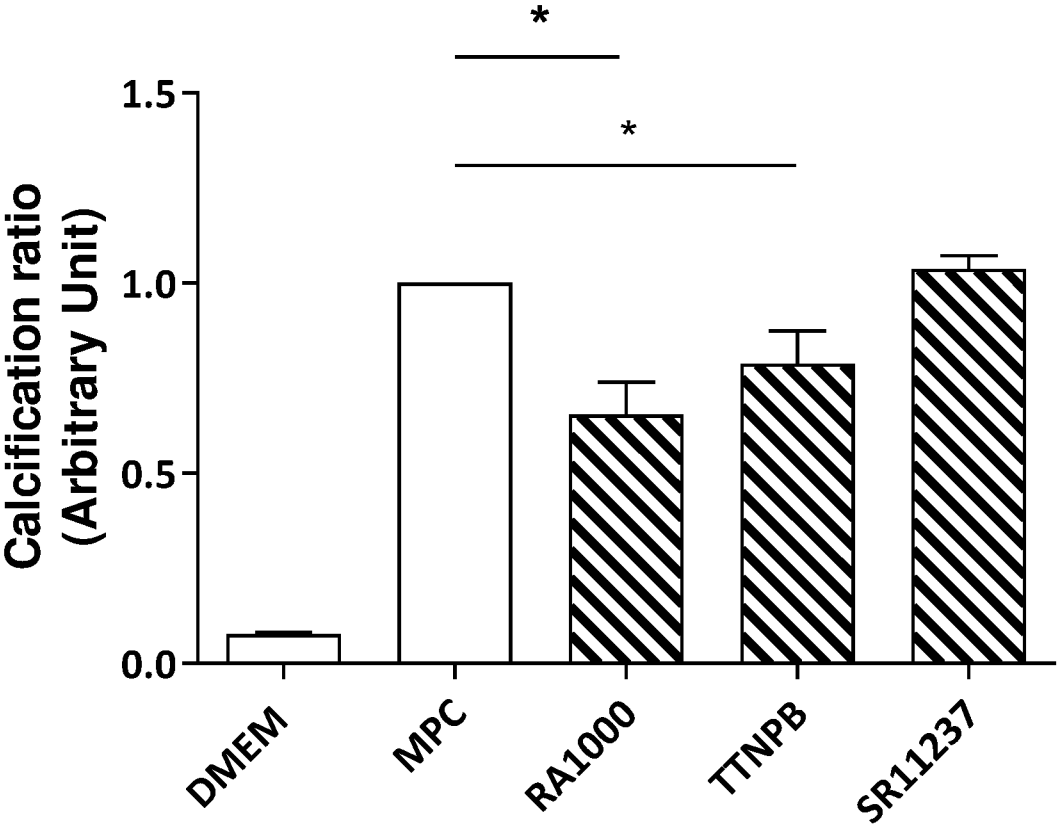


Figure 2A

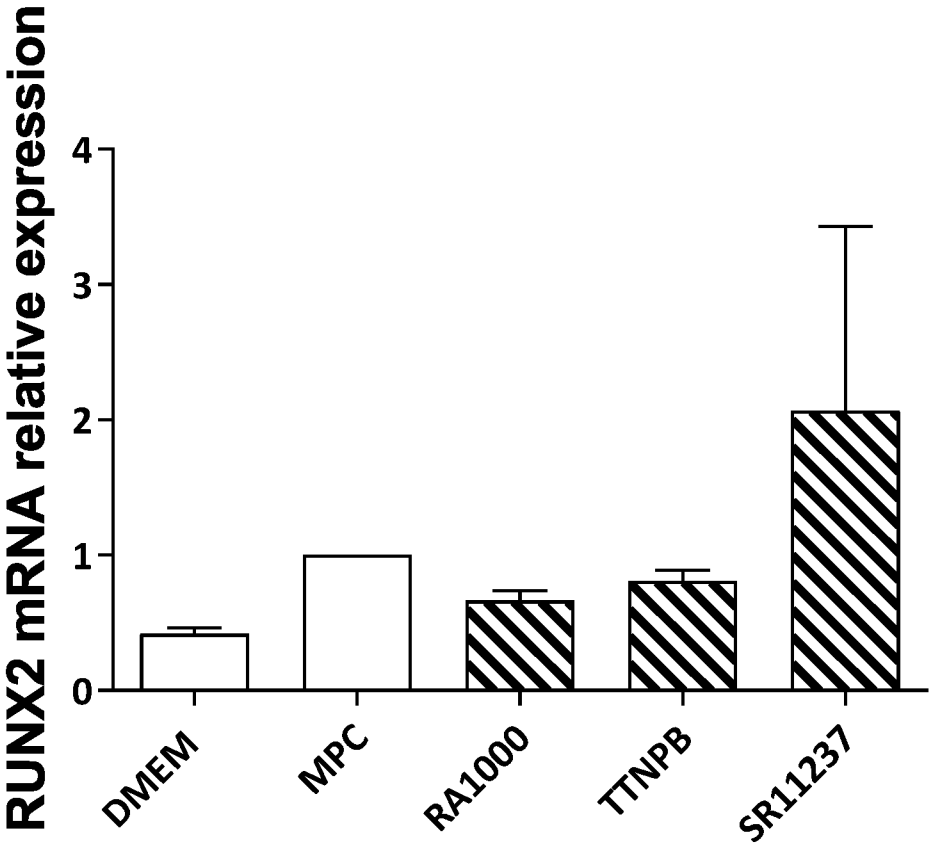


Figure 2B

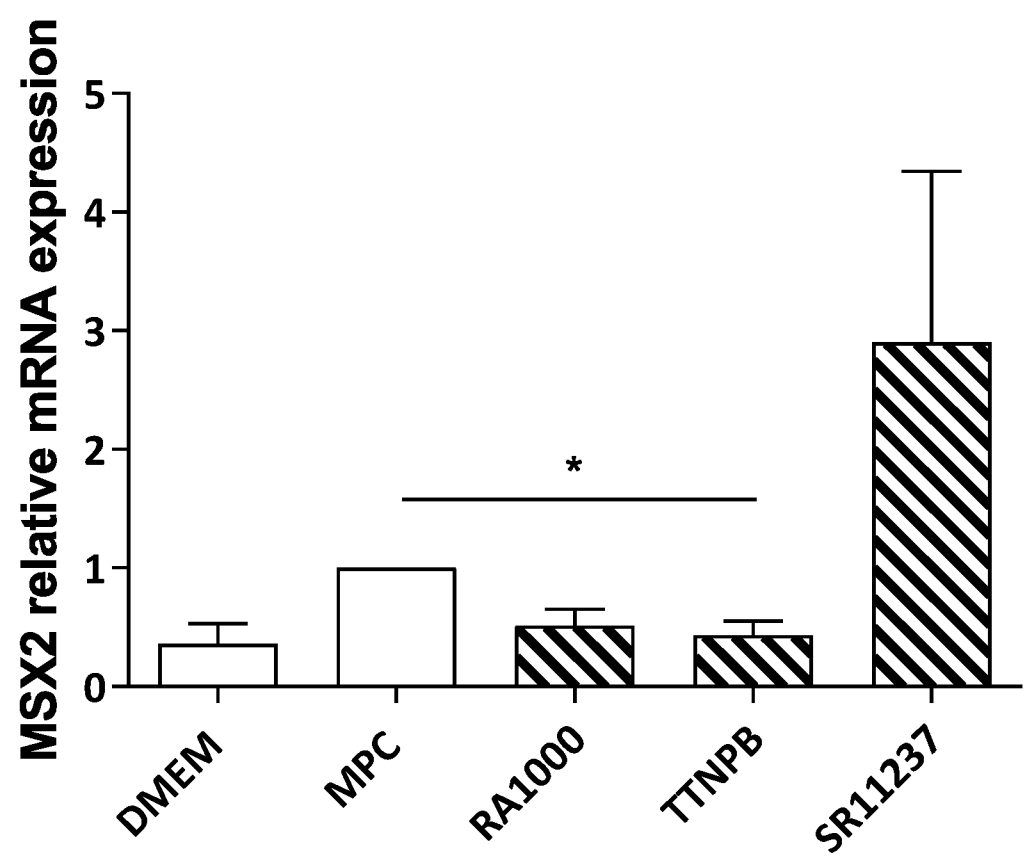


Figure 2C

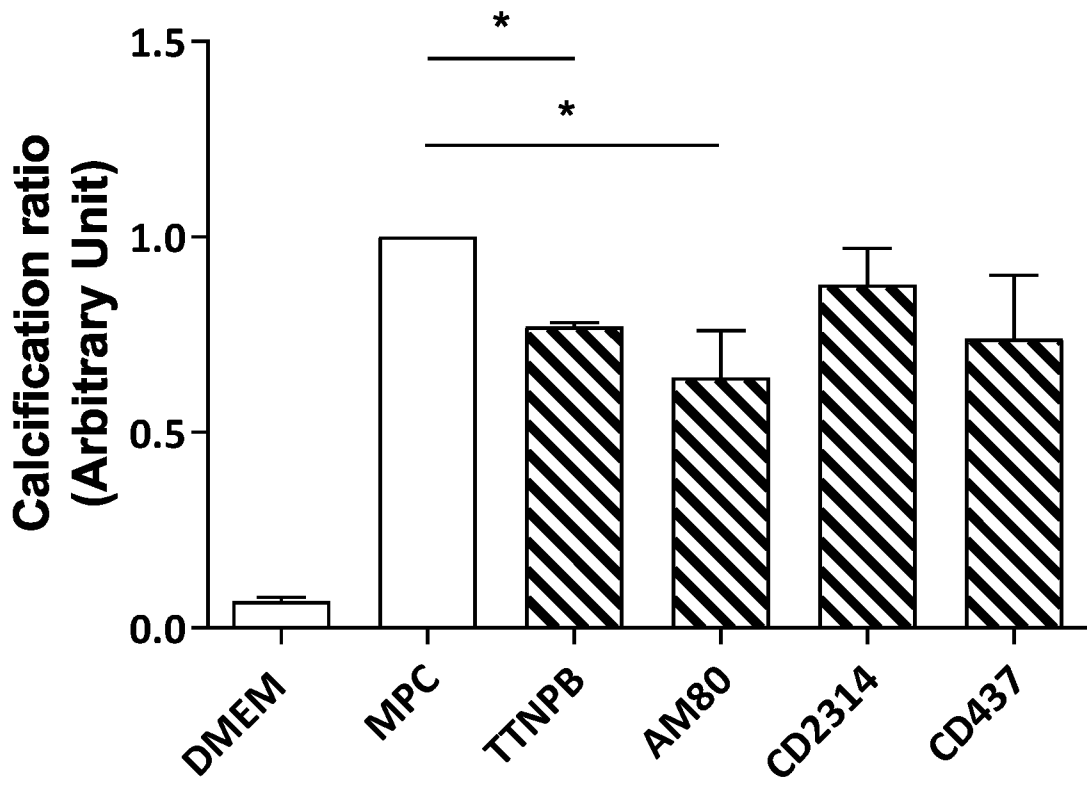


Figure 3A

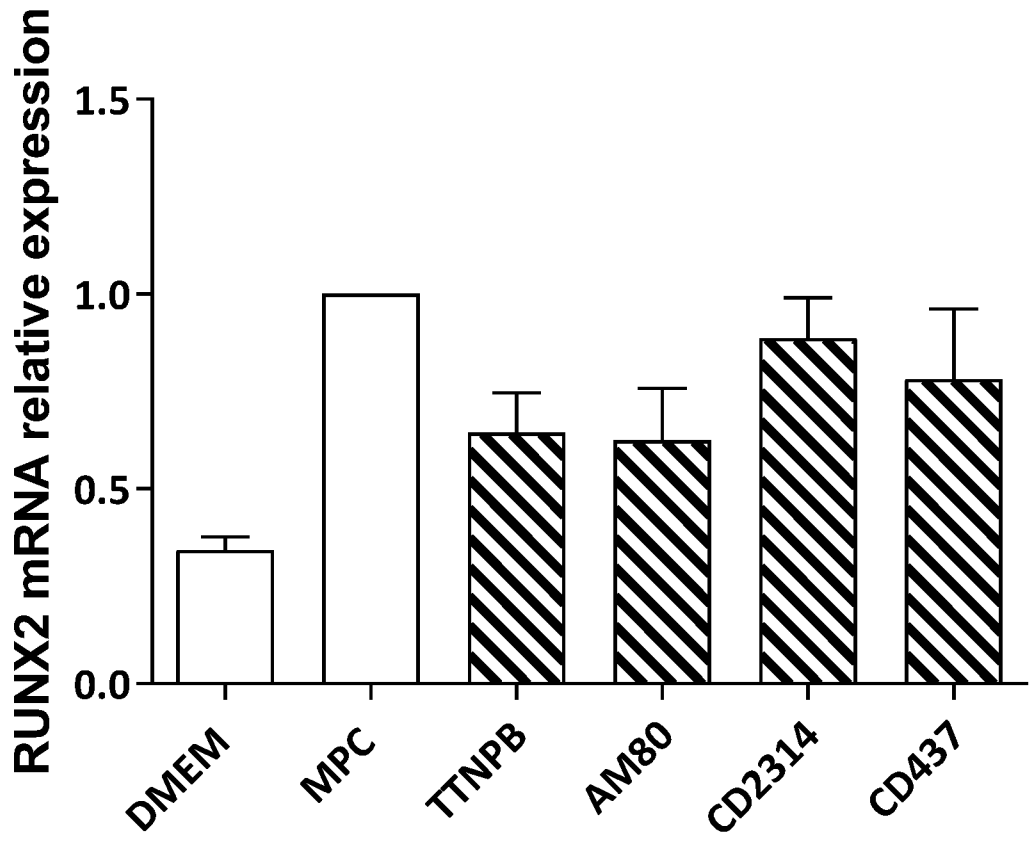


Figure 3B

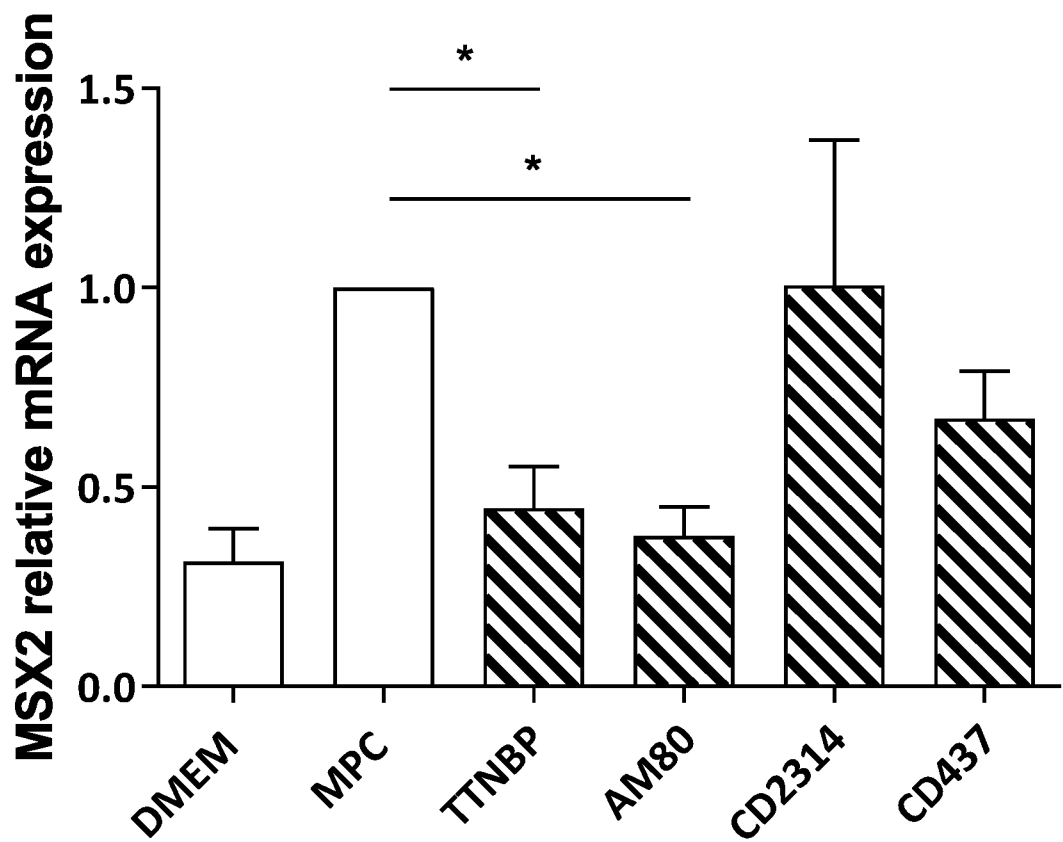


Figure 3C

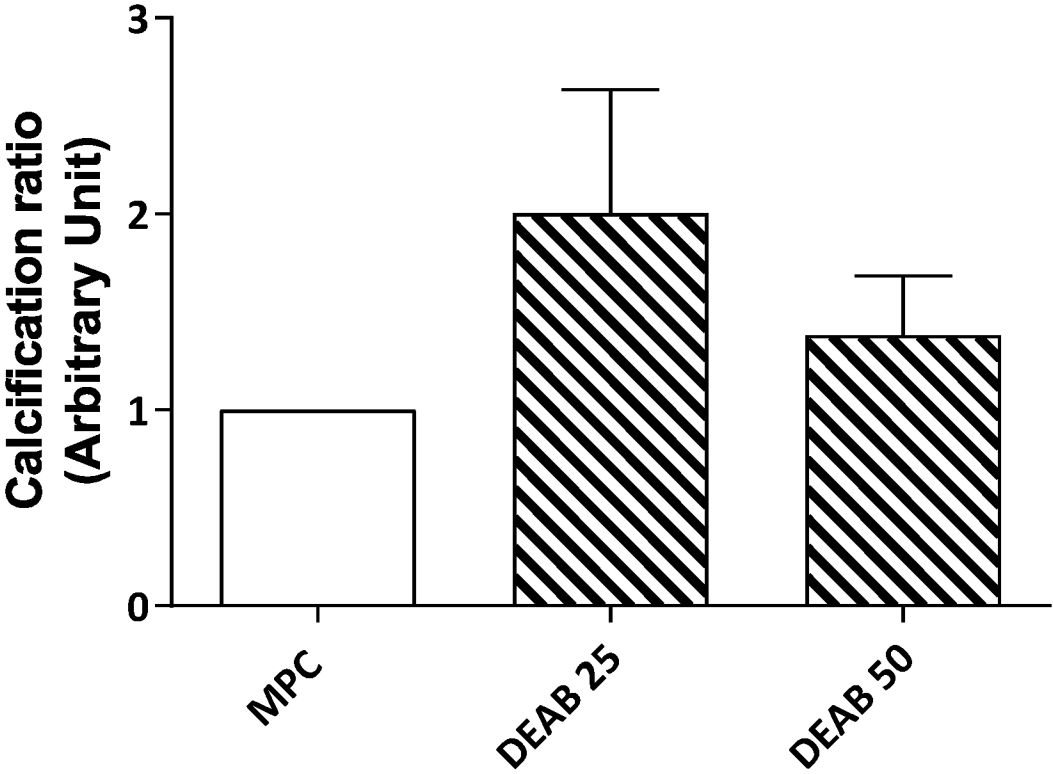


Figure 4A

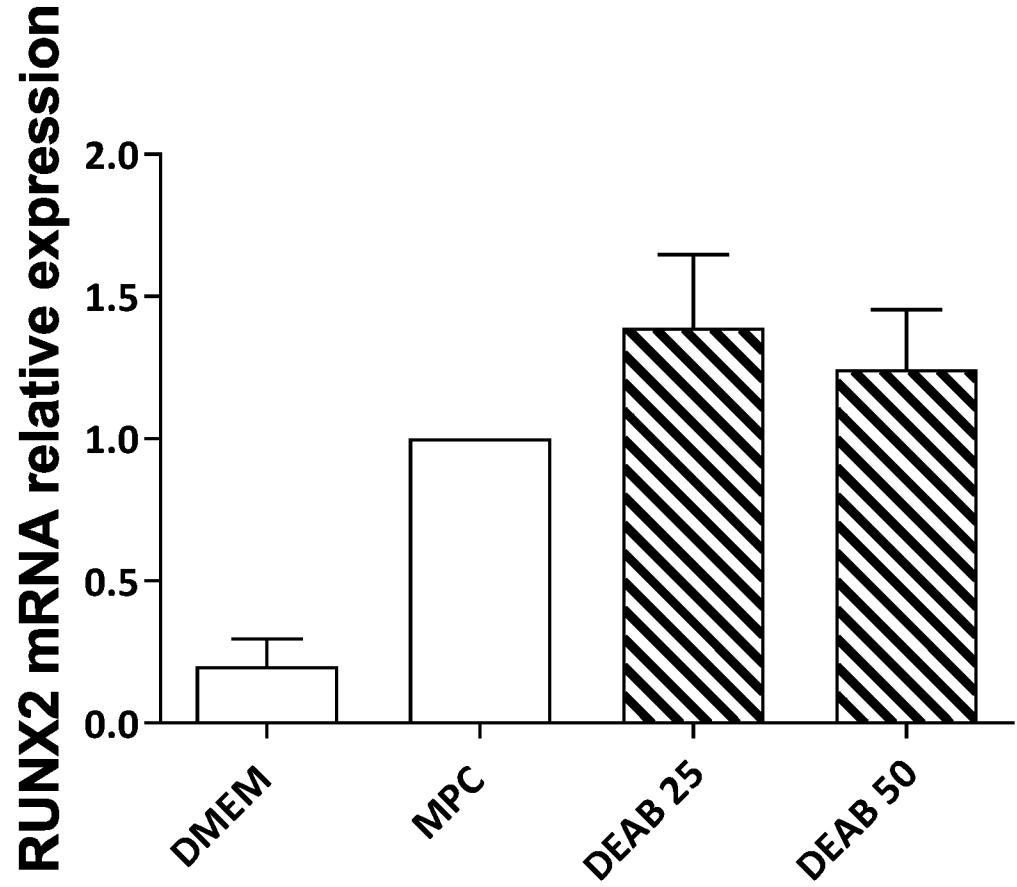


Figure 4B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/077456

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K31/203 A61P9/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUK ET AL: "Increased Dietary intake of Vitamin A promotes Valve Calcification in Vivo.", ARTERIOSCLER. THROMB VASC. BIOL, vol. 33, 2013, - 2013, pages 285-293, XP002798148, page 287 - page 289 ----- -/--	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 November 2020

Date of mailing of the international search report

04/12/2020

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Cattell, James

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2020/077456

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TAKEDA NORIFUMI; MANABE ICHIRO; SHINDO TAKAYUKI; IWATA HIROSHI; IIMURO SATOSHI; KAGECHIKA HIROYUKI; SHUDO KOICHI; NAGAI RYOZO: "Synthetic retinoid Am80 reduces scavenger receptor expression and atherosclerosis in mice by inhibiting IL-6.", ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY, vol. 26, no. q, 2006, - 2006, pages 1177-1183, XP002798149, Effect of Am80 on Atherosclerosis in ApoE deficient mice. -----	1-12
A	PEACOCK JACQUELINE D; LEVAY AGATA K; GILLASPIE DEVIN B; TAO GE; LINCOLN JOY: "Reduced sox9 function promotes heart valve calcification phenotypes in vivo", CIRCULATION RESEARCH, vol. 106, 7 January 2010 (2010-01-07), - 7 January 2010 (2010-01-07), pages 712-719, XP002798150, page 716 - page 718 -----	1-12

Annexe 2 : Brevet américain US 2022/0339322 Use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve



US 20220339322A1

(19) **United States**(12) **Patent Application Publication**
SUSEN et al.(10) **Pub. No.: US 2022/0339322 A1**(43) **Pub. Date: Oct. 27, 2022**(54) **USE OF RETINOIC ACID RECEPTOR (RAR)
AGONISTS FOR REVERSING,
PREVENTING, OR DELAYING
CALCIFICATION OF AORTIC VALVE****Publication Classification**(51) **Int. Cl.***A61L 27/54* (2006.01)*A61K 31/192* (2006.01)*A61K 31/203* (2006.01)*A61K 31/196* (2006.01)*A61L 27/18* (2006.01)(52) **U.S. Cl.**CPC *A61L 27/54* (2013.01); *A61K 31/192*(2013.01); *A61K 31/203* (2013.01); *A61K**31/196* (2013.01); *A61L 27/18* (2013.01);*A61L 2400/02* (2013.01); *A61L 2300/21*(2013.01); *A61L 2430/20* (2013.01)(71) Applicants: **INSERM (Institut National de la
Santé et de la Recherche Médicale),
PARIS (FR); Université de Lille,
LILLE (FR); Institut Pasteur de Lille,
LILLE (FR); Centre Hospitalier
Régional Universitaire de Lille,
LILLE (FR)**(72) Inventors: **Sophie SUSEN, LILLE (FR); Delphine
CORSEAU, LILLE (FR); Yoann
SOTTEJEAU, LILLE (FR); Mickael
ROSA, LILLE (FR); Jérôme
SOQUET, LILLE (FR); Eric VAN
BELL, LILLE (FR); Bart STAELS,
LILLE (FR); Annabelle DUPONT,
LILLE (FR)**(21) Appl. No.: **17/760,568**(22) PCT Filed: **Oct. 1, 2020**(86) PCT No.: **PCT/EP2020/077456**

§ 371 (c)(1),

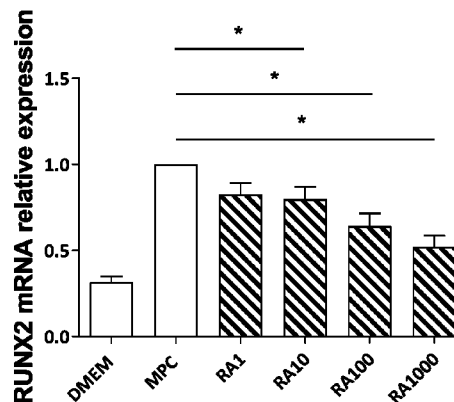
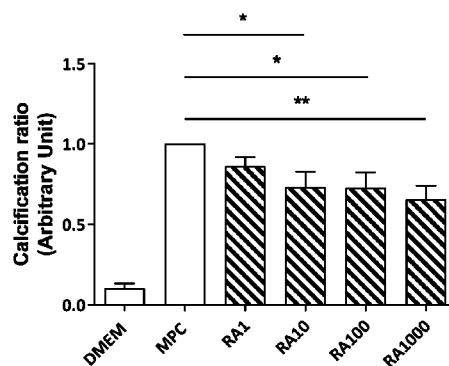
(2) Date: **Mar. 15, 2022**(30) **Foreign Application Priority Data**

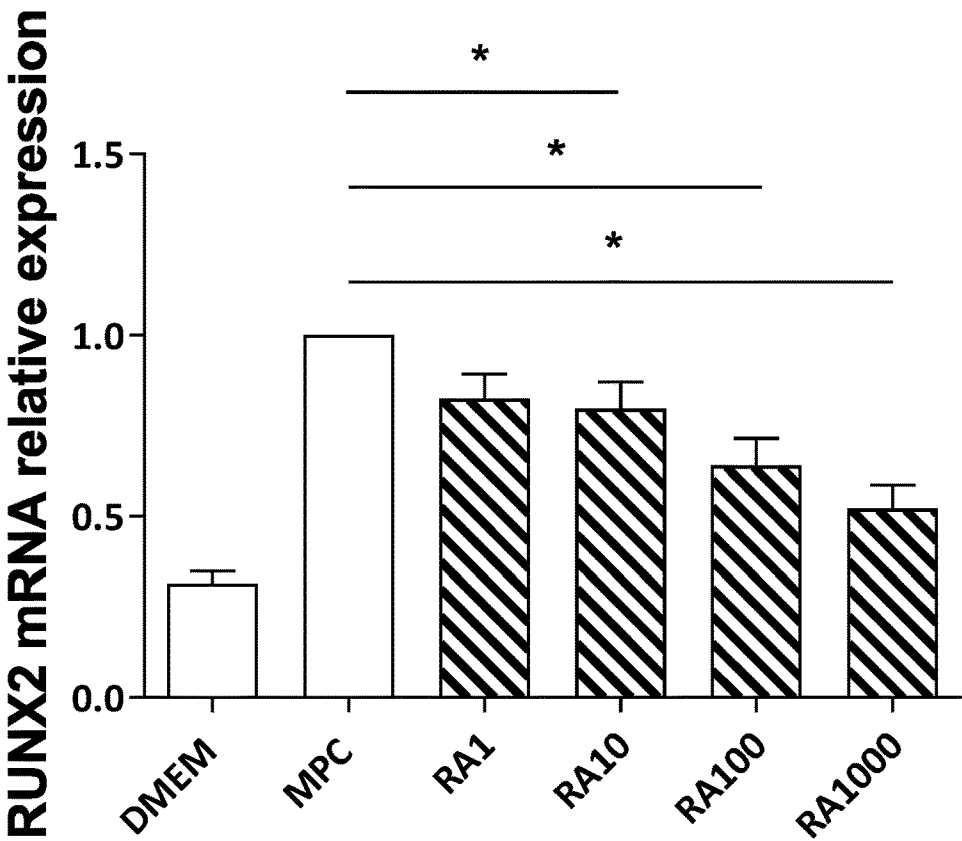
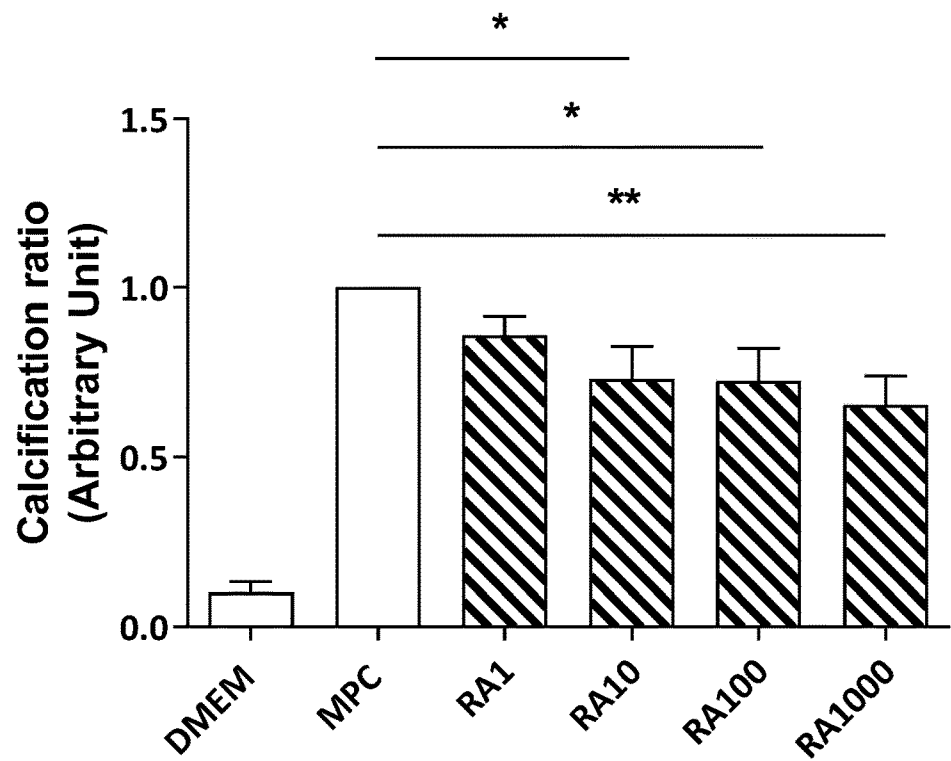
Oct. 2, 2019 (EP) 19306256.9

(57)

ABSTRACT

Aortic valve calcification is a condition in which calcium deposits form on the aortic valve in the heart. These deposits can cause narrowing at the opening of the aortic valve. This narrowing can become severe enough to reduce blood flow through the aortic valve—a condition called aortic valve stenosis. The inventors have shown that retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype in valvular interstitial cells (VICs). More particularly, RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like phenotype in VIC. On the contrary, ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC. Thus the results prompt to consider that use of retinoic acid receptor (RAR) agonists would be suitable for the reversing, preventing or delaying calcification of the aortic valve.





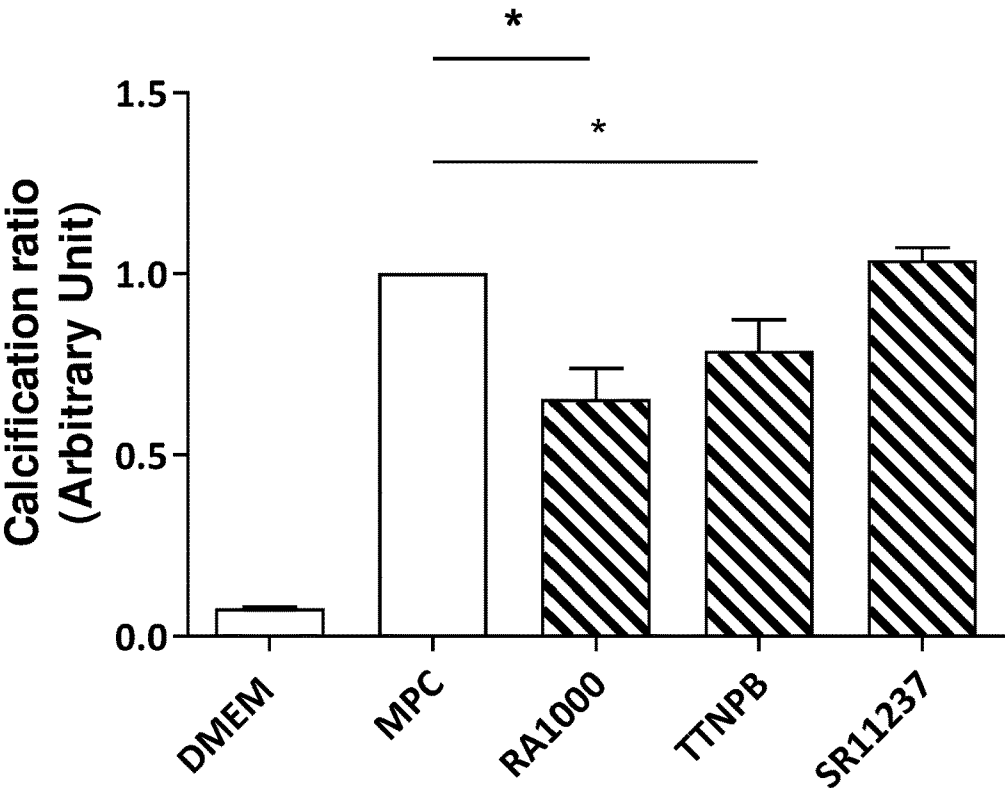


Figure 2A

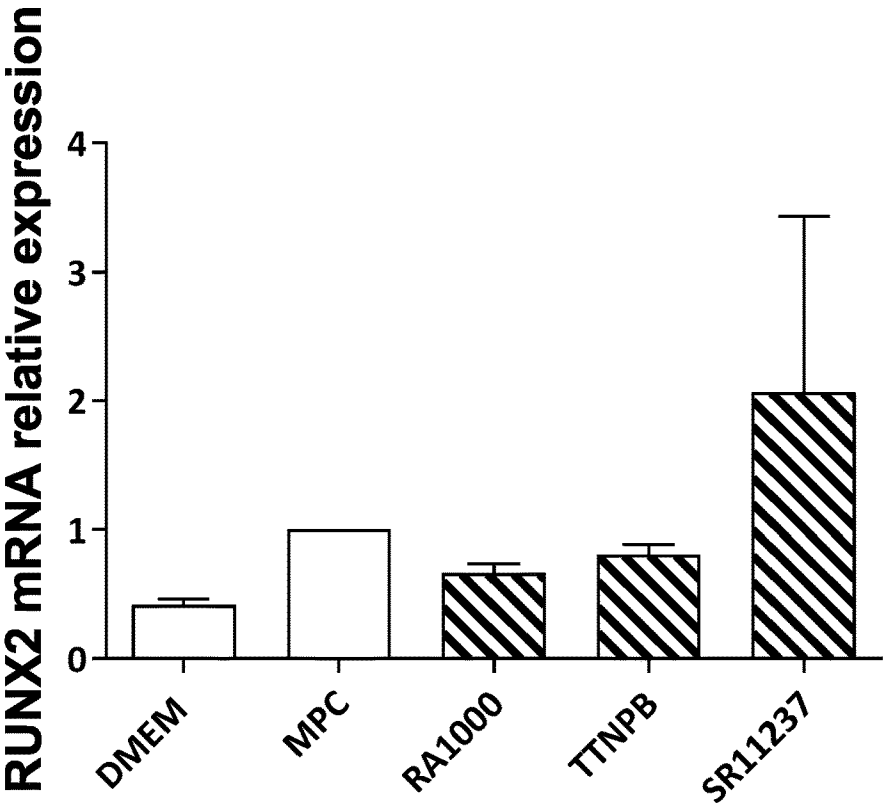


Figure 2B

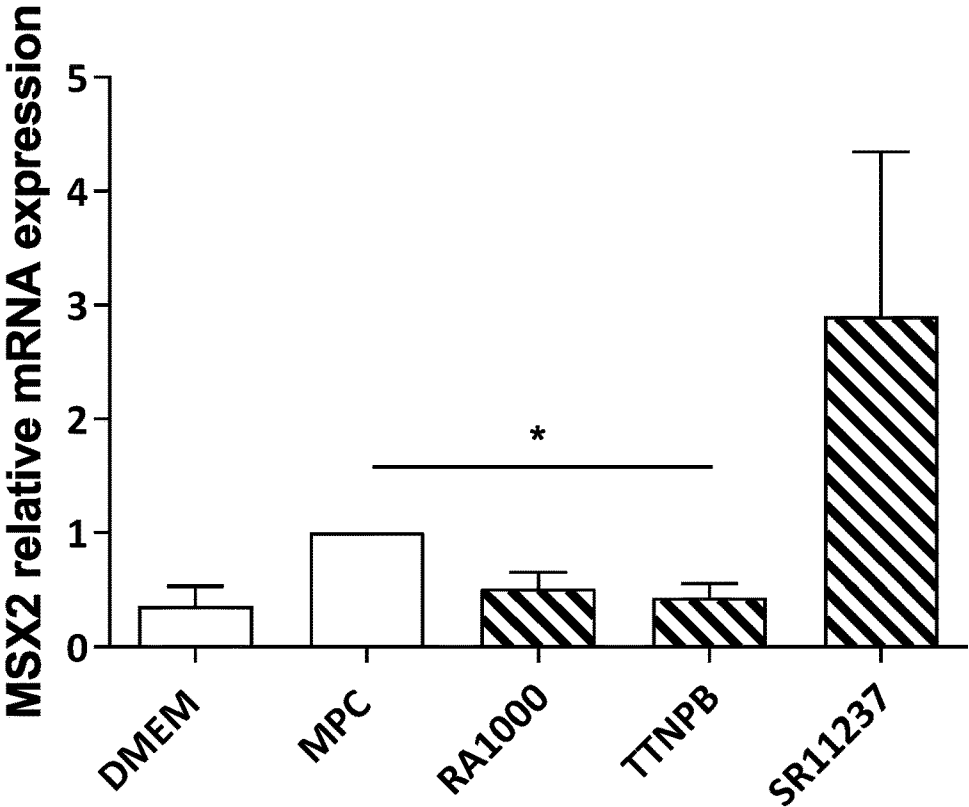


Figure 2C

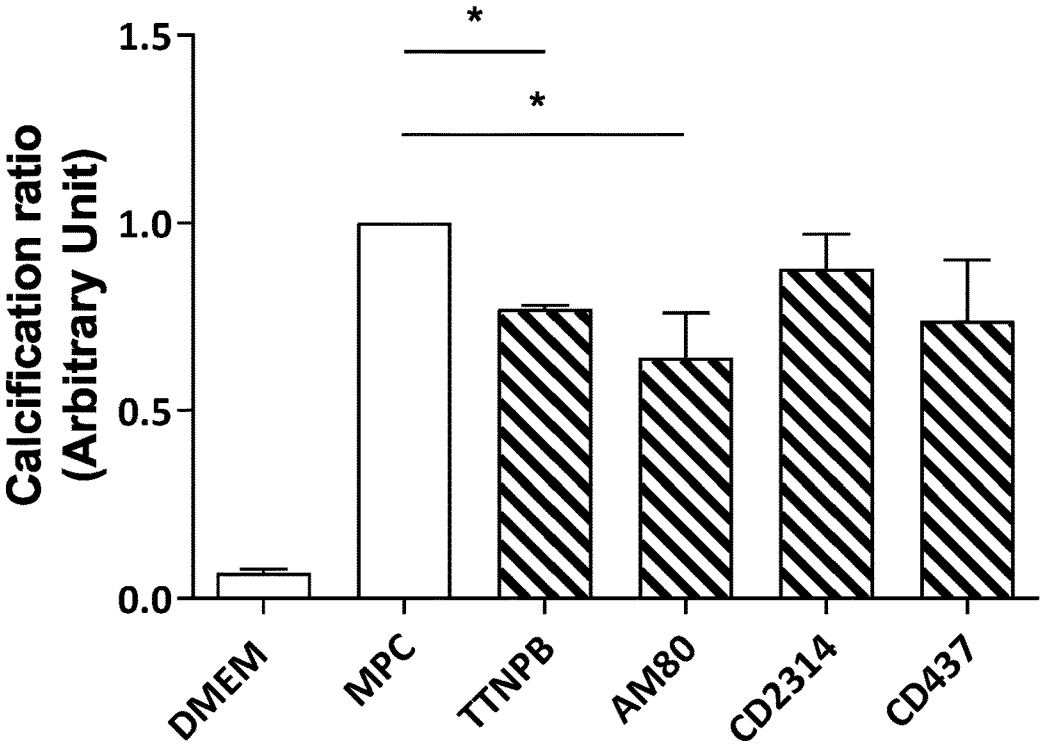


Figure 3A

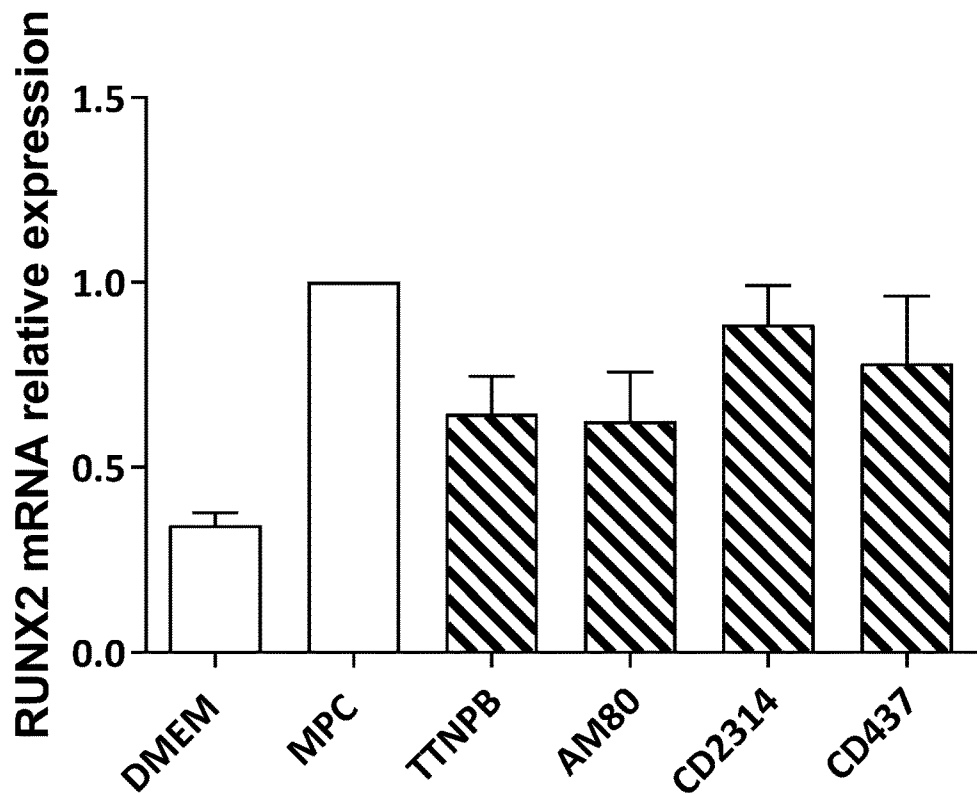


Figure 3B

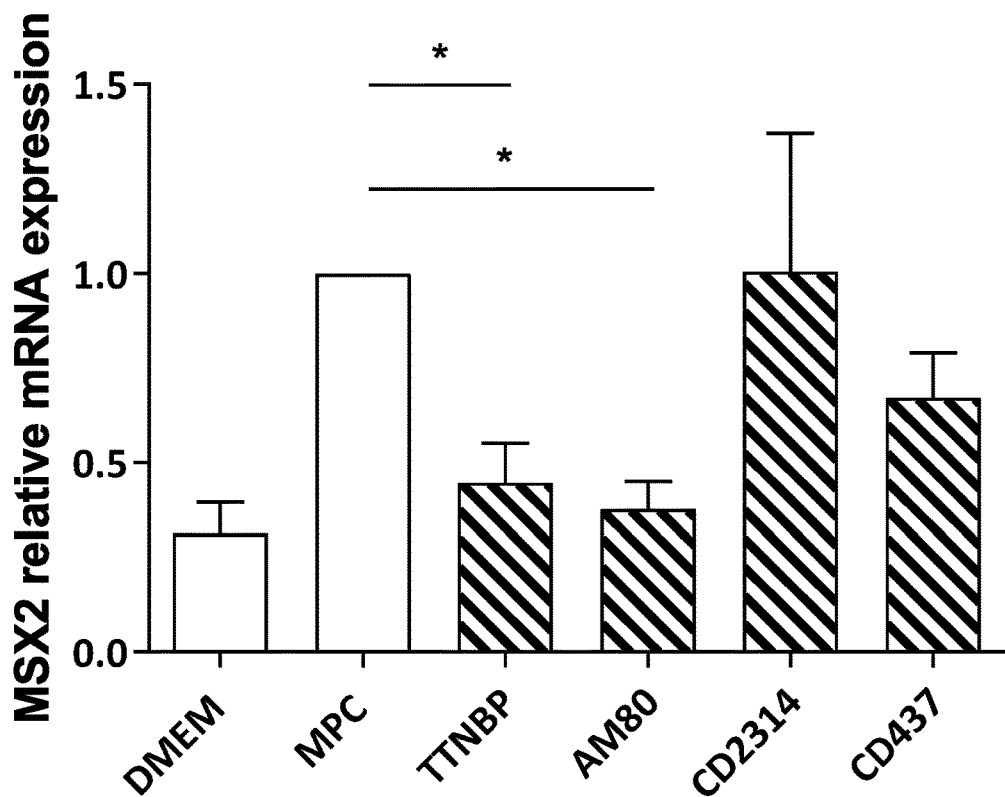


Figure 3C

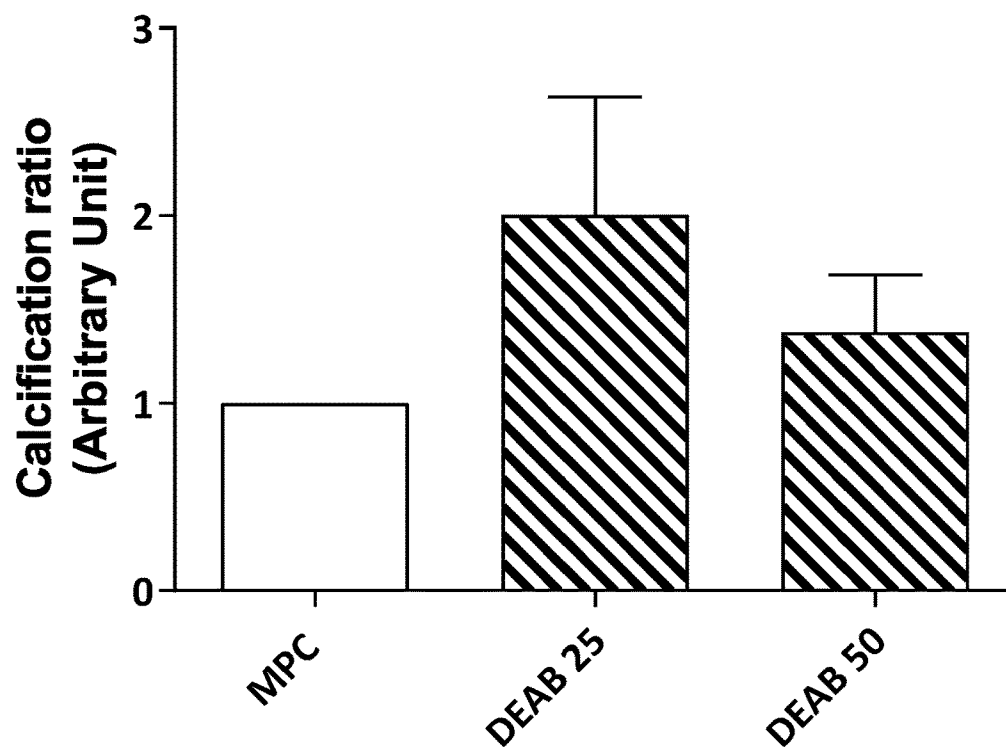


Figure 4A

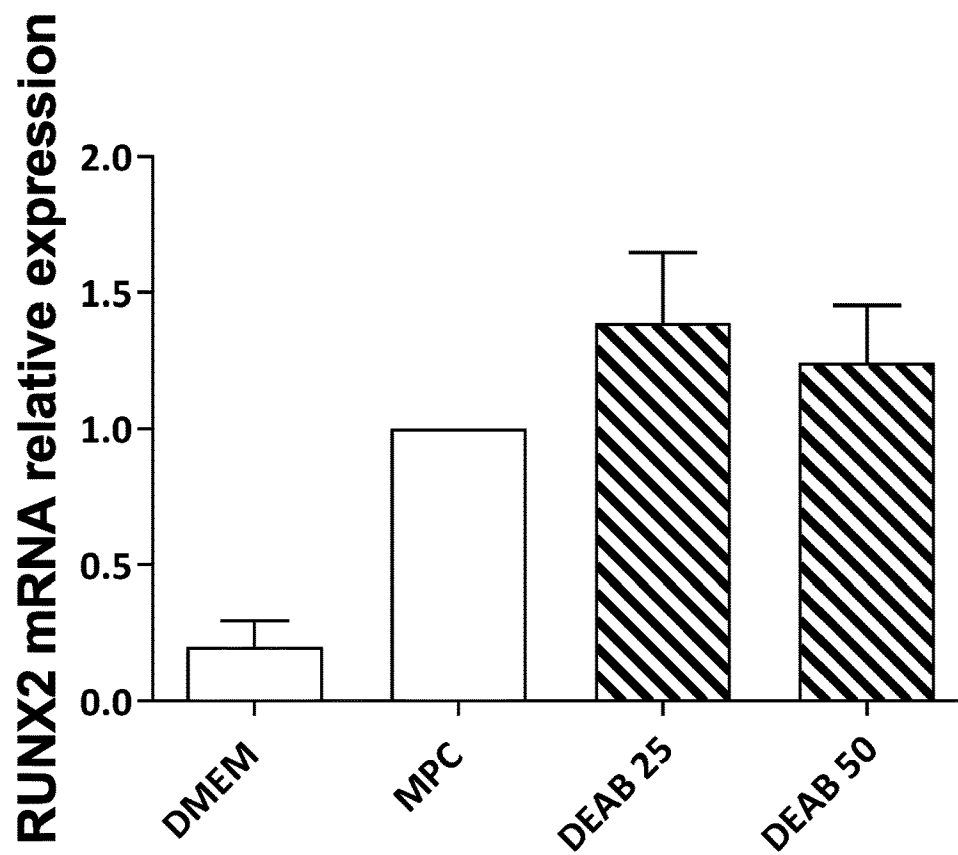


Figure 4B

USE OF RETINOIC ACID RECEPTOR (RAR) AGONISTS FOR REVERSING, PREVENTING, OR DELAYING CALCIFICATION OF AORTIC VALVE

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention is in the field of medicine and in particular in cardiology.

BACKGROUND OF THE INVENTION

[0002] Aortic valve calcification is a condition in which calcium deposits form on the aortic valve in the heart. These deposits can cause narrowing at the opening of the aortic valve. This narrowing can become severe enough to reduce blood flow through the aortic valve - a condition called aortic valve stenosis.

[0003] In particular, calcific aortic valve disease (CAVD) is the most common valvular heart disease in adults, affecting 2-6% of people over 65 years [1]. First described as a passive, degenerative process related to repetitive high mechanical stress, it is now clear that CAVD is an atherosclerosis-like disease mediated by lipid deposition, inflammation, fibrosis and calcification [2, 3]. The symptoms of CAVD vary depending on the degree of valve stenosis. Patients with mild to moderate CAVD may lack symptoms as symptoms typically appear in those patients with severe CAVD. Symptoms can include progressive shortness of breath on exertion, syncope, chest pain, and sudden death. Effective treatments are represented by valve replacement either by transcatheter aortic valve implantation (TAVI) or by surgical aortic valve replacement. In recent time, the use of bioprosthetic valves (BPVs) vs mechanic valves for treating AVS with TAVI has considerably increased. The primary cause of long-term failure of BPV is structural valve deterioration due to tissue calcification. Recent studies have reported similarities between histological findings in stenosed AV and explanted degenerated BPV. So far, no targeted medical therapy is proven to prevent, slow down or treat fibrocalcific AVS or to prevent BPV degeneration.

[0004] Valvular interstitial cells (VICs) are the most prevalent cells found in human aortic valves and play a major role in tissue homeostasis and valve function [4]. These cells represent a heterogeneous and dynamic cell population composed of progenitor cells, quiescent cells, activated cells and osteoblast-like cells [5]. Recent studies have suggested that this latter cell phenotype plays an important role in valve calcification, a hallmark of CAVD [3, 6]. A better understanding of VIC biology, major component of aortic valve and effectors of valve fibrocalcification, may provide therapeutic targets for prevent, slow or stop fibrocalcification progression. Retinoic pathway has documented effects on inflammatory, fibrotic, angiogenesis and calcifying processes in other cells that VIC. For example, retinoid acid, the bioactive metabolic of vitamin A, inhibits osteoblastic mineralization (Lind, 2013) and reduces the expression of osteoprotegerin through activation of retinoid acid receptors in osteoblasts (Jacobson, 2004). Interestingly, retinoid acid is a negative regulator of osteoblast differentiation and inhibits calcifications in mesenchymal progenitor cells which have same properties than VIC to differentiate (Green, 2017). Today there are few data on the role of retinoids and associated nuclear receptors on CAVD. To our knowledge, the only published experimental data on the

potential role of retinoids on aortic valve calcification suggests that an excess of vitamin A dietary intake could promote heart valve calcification (Huk DJ, Hammond HL, Kegechika H, Lincoln J. Increased dietary intake of vitamin A promotes aortic valve calcification in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 February; 33(2):285-93).

SUMMARY OF THE INVENTION

[0005] As defined by the claims, the present invention relates to the use of retinoic acid receptor (RAR) agonists for reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0006] The first object of the present invention relates to a method of reversing, preventing, or delaying calcification of aortic valve in a patient in need thereof comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a retinoic acid receptor (RAR) agonist.

[0007] As used herein, the term “valve” may refer to the valve that prevent the backflow of blood during the rhythmic contractions. There are four main heart valves. In particular, the aortic valve separates the left ventricle and aorta. The term “aortic valve” includes a diseased aortic valve or a bioprosthetic valve.

[0008] As used herein, the term “bioprosthetic valve” is a stented tissue heart valve and may refer to a device used to replace or supplement an aortic valve that is defective, malfunctioning, or missing. Examples of bioprosthetic valve prostheses include, but are not limited to, TS 3fs® Aortic Bioprosthesis, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Ease Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Magna Mitral Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Plus Mitral Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Theon Aortic Heart Valve, Carpentier-Edwards PERIMOUNT Theon Mitral Replacement System, Carpentier-Edwards Aortic Porcine Bioprosthesis, Carpentier-Edwards Duraflex Low Pressure Porcine Mitral Bioprosthesis, Carpentier-Edwards Duraflex mitral bioprosthesis (porcine), Carpentier-Edwards Mitral Porcine Bioprosthesis, Carpentier-Edwards S.A.V. Aortic Porcine Bioprosthesis, Edwards Prima Plus Stentless Bioprosthesis, Edwards Sapien Transcatheter Heart Valve, Medtronic, Freestyle® Aortic Root Bioprosthesis, Hancock® II Stented Bioprosthesis, Hancock II Ultra® Bioprosthesis, Mosaic® Bioprosthesis, Mosaic Ultra® Bioprosthesis, St. Jude Medical, Biocor®, Biocor™ Supra, Biocor® Pericardia, Biocor™ Stentless, Epic™, Epic Supra™, Toronto Stentless Porcine Valve (SPV®), Toronto SPV II®, Trifecta, Sorin Group, Mitroflow Aortic Pericardial Valve®, Cryolife, Cryolife aortic Valve®, Cryolife pulmonic Valve®, Cryolife-O'Brien stentless aortic xenograft Valve® and all variations thereof. Generally, bioprosthetic valve comprise a tissue valve having one or more cusps and the valve is mounted on a frame or stent, both of which are typically elastical. As used herein, the term “elastical” means that the device is capable of flexing, collapsing, expanding, or a combination thereof. The cusps of the valve are generally made from

tissue of mammals such as, without limitation, pigs (porcine), cows (bovine), horses, sheep, goats, monkeys, and humans.

[0009] As used herein, the expression “calcification of the aortic valve” has its general meaning in the art and refers to formation, growth or deposition of extracellular matrix hydroxyapatite (calcium phosphate) crystal deposits in the aortic valve, including a bioprosthetic valve.

[0010] In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for primary prevention of calcification. In particular, the method of the present invention is suitable for the treatment of calcific aortic valve disease. As used herein, the term “calcific aortic valve disease” or “CAVD” has its general meaning in the art and refers to a slowly progressive disorder with a disease continuum that ranges from mild valve thickening without obstruction of blood flow, termed aortic sclerosis, to severe calcification with impaired leaflet motion, or aortic stenosis. Thus disease progression is generally characterized by a process of thickening of the valve leaflets and the formation of calcium nodules—often including the formation of actual bone—and new blood vessels, which are concentrated near the aortic surface. End-stage disease, e.g., calcific aortic stenosis, is generally characterized pathologically by large nodular calcific masses within the aortic cusps that protrude along the aortic surface into the sinuses of Valsalva, interfering with opening of the cusps. In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for the treatment of calcific aortic stenosis.

[0011] In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for secondary prevention of calcification. In particular, the method of the present invention is particularly suitable for preventing degeneration of an implanted bioprosthetic valve. Thus in some embodiment, the method of the present invention is particularly suitable for delaying or preventing the calcification of a bioprosthetic valve after valve replacement either surgically or after transcatheter aortic valve implantation (TAVI).

[0012] As used herein, the term “treatment” or “treat” refer to both prophylactic or preventive treatment as well as curative or disease modifying treatment, including treatment of patient at risk of contracting the disease or suspected to have contracted the disease as well as patients who are ill or have been diagnosed as suffering from a disease or medical condition, and includes suppression of clinical relapse. The treatment may be administered to a subject having a medical disorder or who ultimately may acquire the disorder, in order to prevent, cure, delay the onset of, reduce the severity of, or ameliorate one or more symptoms of a disorder or recurring disorder, or in order to prolong the survival of a subject beyond that expected in the absence of such treatment. By “therapeutic regimen” is meant the pattern of treatment of an illness, e.g., the pattern of dosing used during therapy. A therapeutic regimen may include an induction regimen and a maintenance regimen. The phrase “induction regimen” or “induction period” refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the initial treatment of a disease. The general goal of an induction regimen is to provide a high level of drug to a patient during the initial period of a treatment regimen. An induction regimen may employ (in part or in whole) a “loading regimen”, which may include administering a greater dose of the drug than a physician would employ during a maintenance regimen, administering a drug more

frequently than a physician would administer the drug during a maintenance regimen, or both. The phrase “maintenance regimen” or “maintenance period” refers to a therapeutic regimen (or the portion of a therapeutic regimen) that is used for the maintenance of a patient during treatment of an illness, e.g., to keep the patient in remission for long periods of time (months or years). A maintenance regimen may employ continuous therapy (e.g., administering a drug at a regular intervals, e.g., weekly, monthly, yearly, etc.) or intermittent therapy (e.g., interrupted treatment, intermittent treatment, treatment at relapse, or treatment upon achievement of a particular predetermined criteria [e.g., disease manifestation, etc.]).

[0013] In some aspects, the method of the present invention is particularly suitable for preventing stenosis. As used herein, the term “stenosis” refers to the narrowing of the aortic valve that could block or obstruct blood flow from the heart and cause a back-up of flow and pressure in the heart.

[0014] As used herein, the term “retinoic acid receptor” or “RAR” has its general meaning in the art and refers to a type of nuclear receptor which can also act as a transcription factor that is activated by both all-trans retinoic acid and 9-cis retinoic acid. There are three retinoic acid receptors (RAR), RAR α , RAR β and RAR γ , encoded by the RARA, RARB, RARG genes, respectively. Each receptor isoform has ten splice variants: four for alpha, four for beta, and two for gamma. RAR receptors activate transcription by binding to DNA sequence elements, known as RAR response elements (RARE), in the form of a heterodimer with retinoid X receptors (known as RXRs).

[0015] As used herein, the term “retinoic acid receptor (RAR) agonist” is intended to mean those compounds recognized in the art as those capable of acting through retinoic acid receptors and are efficient at inducing RARE-dependent gene expression. Preferably, the RAR agonist is a RAR α agonist. The prior art contains a large number of chemical compounds that are RAR agonists. Among the prior art documents, mention may, for example, be made of patent EP 0 816 352 B1 which describes aromatic biaryl heterocyclic compounds for the treatment of dermatological, rheumatic, respiratory and ophthalmological conditions, but also for cosmetic uses, document WO 2005/056510 which describes molecules comprising an aromatic ring substituted with a hydroxyalkyl radical, documents WO 99/10308 and WO 2006/066978 which describe substituted biphenyl derivatives, documents U.S. Pat. No. 6,218,128 and EP 0879814 which describe bicyclic and/or tricyclic compounds, document EP 0850909 which describes stilbene compounds, document WO 98/56783 which describes biaromatic compounds, and documents EP 0776885 and EP 0776881 which describe biaromatic compounds comprising adamantyl groups. The RAR agonist selectivity of a compound can be determined by routine ligand binding assays known to one of skill in the art such as described in C. Apfel et al., Proc. Nat. Sci. Acad. (USA), 89: 7129-7133 (1992); M. Teng et al., J. Med. Chem., 40: 2445-2451 (1997); and PCT Publication WO 96/30009. For instance known RAR α agonists include but are not limited to: TTNPB, tamibarotene, 9-cis-retinoic acid, trans-retinoic acid, AGN193836, Ro 40-6055, CD666, and BMS753. In some embodiments, the RAR α agonist is 4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)amino]carbonyl]benzoic acid (AM80).

[0016] By a “therapeutically effective amount” is meant a sufficient amount of the agonist of the present invention for the treatment of the aortic valve stenosis at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the compound will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular subject will depend upon a variety of factors including the age, body weight, general health, sex and diet of the subject; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Preferably, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the subject to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, preferably from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

[0017] Typically, the agonist of the present invention may be combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. “Pharmaceutically” or “pharmaceutically acceptable” refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. The agonist of the present invention can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine,

procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils.

[0018] The present invention also relates to the use of a RAR agonist of the present invention for the preparation of bioprosthetic valve. In this respect, the invention relates more particularly to bioprosthetic valve comprising an amount of a RAR agonist. Such a local biomaterial or medical delivery device can be used to treat aortic valve stenosis. Such biomaterial or medical delivery device may be biodegradable. The agonist of the invention is preferably entrapped into the cusps of the valve. The cusps of the valve are generally made from tissue of mammals such as, without limitation, pigs (porcine), cows (bovine), horses, sheep, goats, monkeys, and humans. With said entrapment, it is possible to achieve a high level of local action. According to the present invention, the valve may be a collapsible elastical valve having one or more cusps and the collapsible elastical valve may be mounted on an elastical stent. In some embodiments, the collapsible elastical valve may comprise one or more cusps of biological origin. In some embodiments, the one or more cusps are porcine, bovine, or human. The elastical stent portion of the valve prosthesis used in the present invention may be self-expandable or expandable by way of a balloon catheter. The elastical stent may comprise any biocompatible material known to those of ordinary skill in the art. Examples of biocompatible materials include, but are not limited to, ceramics; polymers; stainless steel; titanium; nickel-titanium alloy, such as nitinol; tantalum; alloys containing cobalt, such as Elgiloy® and Phynox®; and the like. The process of disposing the coating composition which comprises the RAR agonist of the present invention may be any process known in the art. The local delivery according to the present invention allows for high concentration of the agonist of the present invention at the disease site with low concentration of circulating compound. For purposes of the invention, a therapeutically effective amount will be administered.

[0019] The invention will be further illustrated by the following figures and examples. However, these examples and figures should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

FIGURES

[0020] FIG. 1: Retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype

[0021] A: Calcification ratio of VIC treated with retinoic acid (1; 10; 100 or 1000 nM) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. B RUNX2 and relative mRNA expression in VIC treated with retinoic acid (1; 10; 100 or 1000 nM) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are presented as mean±SEM, *: p<0.05

[0022] FIG. 2: Retinoids reduce calcification and osteoblast-like phenotype in a RAR activation dependent manner

[0023] A: Calcification ratio of VIC treated with retinoic acid, Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist) or SR11237 (RXR agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. B and C: RUNX2 and MSX2 relative mRNA expression in VIC treated with retinoic acid, Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist) or SR11237 (RXR agonist) in pro-calcifying medium for 7

days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are presented as mean±SEM, *: p<0.05

[0024] FIG. 3: RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like phenotype in VIC

[0025] A: Calcification ratio of VIC treated with Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist), AM80 (RAR α agonist), CD2314 (RAR β agonist) or CD437 (RAR γ agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. B and C: RUNX2 and MSX2 relative mRNA expression in VIC treated with Arotinoid acid (TTNB, RAR agonist), AM80 (RAR α agonist), CD2314 (RAR β agonist) or CD437 (RAR γ agonist) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. Data are presented as mean±SEM, *: p<0.05

[0026] FIG. 4: ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC

[0027] A: Calcification ratio of VIC treated with 4-Diethylaminobenzaldehyde 25 or 50 nM, (DEAB, ALDH inhibitor) in pro-calcifying medium for 7 days. Pro-calcifying medium condition is set at 1. B: RUNX2 relative mRNA expression in VIC treated with DEAB in procalcifying medium for 7 days.

EXAMPLE

Methods

[0028] Modulation of retinoic acid signaling in pro-calcifying conditions

[0029] VIC were treated for 7 days in a medium composed of DMEM with 10% FBS, supplemented with ascorbic acid (283 μ M, Sigma Aldrich), Sodium Phosphate (3 mM, Sigma Aldrich) and dexamethasone (100 nM, Stem Cell technologies). VIC were treated with retinoic acid (RA: 1; 10; 100; 1000 nM), TTNPB (RAR pan agonist, 1 μ M) AM80 (RAR α specific agonist, 1 μ M), CD2314 (RAR β specific agonist, 1 μ M), CD437 (RAR γ specific agonist, 1 μ M) or 4-Diethylaminobenzaldehyde (DEAB, ALDH inhibitor, 25, 50 nM).

[0030] Calcification Measurement

[0031] After 7 days of treatment, VIC were rinsed twice in PBS then fixed in paraformaldehyde 4% for 15 minutes. After washing with deionized water, calcium deposits were stained with an alizarin red solution (1%, pH 6.38) for 10 minutes. Then, cells were washed with deionized water and staining was fixed with absolute ethanol. Quantification is performed according to Gregory et al method. Briefly, cells were incubated with acetic acid 10% for 30 minutes under smooth shaking. Cells were then transferred to a microtube and vortexed for 30 seconds. Mineral oil was added to each tube and samples were heated for 10 minutes à 85° C. and cooled in ice for 5 minutes. After centrifugation (15 minutes, 16.000 g), supernatants are collected and 200 μ l of ammonium hydroxide are added. Samples are then read at 405 nm in a microplate.

[0032] Quantitative PCR

[0033] RNA was extracted from VICs after homogenization in TRIzol reagent (Life Technologies), following the Chomczynski and Sacchi protocol. For gene expression analysis, 2 micrograms of total extracted RNA were reverse transcribed with the High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies) in a total volume of 20 μ l, according to manufacturer's procedures. Samples were incubated at 25° C. for 10 min, followed by 2 h at 37° C. The obtained cDNA were stored at -20° C. Quantitative PCR was performed using an ABI PRISM 7000 Detection System

(Life Technologies). Four microliters of reverse transcription product were added to 16 μ l of a mix consisting of 10 μ l of master mix containing Taq polymerase, MgCl₂, and dNTPs (Life Technologies), 1 μ l solution containing sense and antisense primers and TaqMan® probe specific for the gene of interest and 5 μ l of water. The expressions of the transcripts were normalized by Abelson (ABL) mRNA expression, used as an endogenous reference gene. The relative quantification of the transcripts was performed using the cycle threshold (Ct) comparative method and calculated with the formula 2^{−ΔΔCt}. For each sample, detection of PCR products was performed separately and in duplicate. ABL (Hs01104728_m1), RUNX2 (Hs00231692_m1) and MSX2 (Hs00741177_m1) commercial assays were purchased from Life Technologies.

[0034] Statistical Analyses

[0035] All data are reported as mean ±SEM. A Student t-test for continuous variables were used. For all analysis, a p-value <0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, Ill.).

Results

[0036] The results are depicted in FIGS. 1-4. FIGS. 1A and 1B show that retinoic acid decreases calcification and osteoblast-like phenotype. FIGS. 2A-2C show that retinoids reduce calcification and osteoblast-like phenotype in a RAR activation dependent manner. Moreover, FIGS. 3A-3C show that: RAR α activation reduces calcification and osteoblast-like phenotype in VIC. Finally, FIGS. 4A and 4B show that ALDH1A1 inhibition increases calcification and osteoblast-like phenotype in VIC.

REFERENCES

- [0037]** Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.
- [0038]** 1. Nishimura R A, Otto C M, Bonow R O et al (2014) 2014 AHA/ACC guideline for the management of patients with valvular heart disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 63(22): e57-185. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.536
- [0039]** 2. Yetkin E, Waltenberger J (2009) Molecular and cellular mechanisms of aortic stenosis. *Int J Cardiol* 135(1): 4-13. doi:10.1016/j.ijcard.2009.03.108
- [0040]** 3. Lindman B R, Clavel M A, Mathieu P et al (2016) Calcific aortic stenosis. *Nat Rev Dis Primers* 2:16006. doi:10.1038/nrdp.2016.6
- [0041]** 4. Taylor P M, Batten P, Brand N J, Thomas P S, Yacoub M H (2003) The cardiac valve interstitial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 35(2):113-118
- [0042]** 5. Liu A C, Joag V R, Gotlieb A I (2007) The emerging role of valve interstitial cell phenotypes in regulating heart valve pathobiology. *Am J Pathol* 171(5):1407-1418. doi: 10.2353/ajpath.2007.070251
- [0043]** 6. Cloyd K L, El-Hamamsy I, Boonrungsiman S et al (2012) Characterization of porcine aortic valvular interstitial cell 'calcified' nodules. *PLoS ONE*. doi:10.1371/journal.pone.0048154

1. A method of reversing, preventing, or delaying calcification of an aortic valve in a patient in need thereof

comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a retinoic acid receptor (RAR) agonist.

2. The method of claim 1 wherein the aortic valve is a diseased aortic valve.

3. The method of claim 2 wherein the patient suffers from a calcific aortic valve disease.

4. The method of claim 1 wherein the aortic valve is an implanted bioprosthetic valve.

5. The method of claim 4, wherein the step of administering prevents degeneration of the implanted bioprosthetic valve.

6. The method of claim 4 wherein the implanted bioprosthetic valve was implanted either surgically or after transcatheter aortic valve implantation (TAVI).

7. The method of claim 1 wherein the RAR agonist is a RAR α agonist.

8. The method of claim 7 wherein the RAR α agonist is selected from the group consisting of TTNPB, tamibarotene, 9-cis-retinoic acid, trans-retinoic acid, AGN193836, Ro

40-6055, CD666, and 4-[[[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)amino]carbonyl]benzoic acid (AM80).

9. A method of preparing an aortic bioprosthetic valve, comprising, during preparation, entrapping an amount of a RAR agonist within cusps of the aortic bioprosthetic valve, wherein the amount is sufficient to prevent calcification of the aortic bioprosthetic valve after implantation.

10. An aortic bioprosthetic valve comprising an amount of a RAR agonist sufficient to prevent calcification of the aortic bioprosthetic valve after implantation.

11. The aortic bioprosthetic valve of claim 10 wherein the RAR agonist is entrapped into cusps of the aortic bioprosthetic valve.

12. The aortic bioprosthetic valve of claim 10, wherein the amount of the RAR agonist is sufficient to prevent stenosis of the aortic bioprosthetic valve.

* * * * *

Annexe 3 : Protocole de rinçage et de conservation de la racine aortique porcine avant implantation chez l'agneau

Etape 1 (5 à 30 minutes) : rinçage immédiat de la racine aortique porcine après prélèvement

Solution de rinçage (conservée à 4°C) :

Acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 0.1%	0.5 g
Aprotinine 10 kIU/mL	0.2 mL
Phosphate-buffered saline (PBS) stérile 1X	500 mL

Etape 2 (24 à 168 heures) : conservation de la racine aortique porcine à 4°C

Solution de conservation (conservée à 4°C) :

EDTA 0.1%	0.5 g
Aprotinine 10 kIU/mL	0.2 mL
Pénicilline G 5 kUI/mL / streptomycine 5 mg/mL	10 mL
Amphotéricine B 2.5 U/mL	5 mL
PBS stérile 1X	500 mL

Etape 3 (30 minutes) : rinçage de la racine aortique porcine avant implantation à température ambiante

Solution de rinçage (conservée à 4°C) : identique à celle de l'étape 1

Annexe 4 : Page du projet RETINAVS sur le site internet de l'Agence Nationale de la Recherche

Voie de l'acide rétinoïque et fibrocalcification dans la sténose valvulaire aortique – RETINAVS

Résumé de soumission



La sténose valvulaire aortique (SVA) fibrocalcifiée se caractérise par un rétrécissement de l'orifice de la valve aortique (VA) entraînant un obstacle à l'éjection du sang du ventricule gauche. Sa prévalence dans les pays industrialisés est de 2 à 6% chez les sujets de plus 65 ans. Elle est en constante augmentation du fait du vieillissement de la population. Initialement décrite comme un processus dégénératif lié à l'agression de la VA par le flux sanguin, la SVA est désormais considérée comme une pathologie liée à des processus actifs similaires à ceux de l'athérosclérose : inflammation, fibrose, angiogenèse et calcification. Même si d'importants progrès ont été accomplis dans la compréhension de la physiopathologie de cette maladie, il n'existe à ce jour aucun traitement pharmacologique permettant d'en ralentir la progression ou de la faire régresser. De mauvais pronostic dès l'apparition des symptômes, la seule thérapeutique efficace de la SVA est le remplacement de la VA par une prothèse mécanique ou une bioprothèse. Dans les pays industrialisés, les bioprothèses sont aujourd'hui majoritairement utilisées. Elles présentent l'avantage de ne pas nécessiter de traitement anticoagulant au long court mais en raison d'une dégénérescence et d'une calcification progressive du tissu, leur durée de vie est limitée (10 ans). Les mécanismes mis en jeu dans ce contexte semblent proches de ceux observés dans la SVA. La VA saine est composée en majorité de cellules interstitielles de valve (VIC). Les VIC présentent de grandes capacités de différenciation de type cellules souches et peuvent ainsi se différencier en cellules calcifiantes de type ostéoblastes ou, comme le montrent nos résultats préliminaires, en cellules périvasculaires. Une analyse préliminaire de VA humaines normales et fibrocalcifiées et de VIC isolées de ces valves nous indique que la voie de l'acide rétinoïque qui agit via des récepteurs nucléaires serait impliquée dans le processus de calcification valvulaire. Les objectifs du projet RETINAVS sont d'étudier plus précisément le rôle de cette voie dans le développement de la SVA et la dégénérescence des bioprothèses en se focalisant sur les processus de calcification et d'angiogenèse, de mettre en évidence de nouveaux facteurs modulant ces processus et d'identifier, dans la voie de l'acide rétinoïque, des cibles pharmacologiques innovantes que nous validerons par des approches précliniques in vitro et in vivo (modèles animaux de calcification valvulaire et de bioprothèse valvulaire). Le projet RETINAVS combine 3 atouts majeurs : 1) une collecte continue de valves aortiques humaines fibrocalcifiées, de prothèses valvulaires dégénérées et de valves normales. L'étude des VA humaines normales est rare dans la littérature et notre accès à ces échantillons représente une avancée dans la compréhension des processus impliqués dans la progression de la maladie, 2) la réunion de biologistes, cardiologues spécialistes de l'athérosclérose, de la SVA et de l'angiogenèse, de chirurgiens cardiaques spécialistes des valvulopathies et de chercheurs fondamentaux impliqués dans le décryptage du rôle de la voie des rétinoïdes et des récepteurs nucléaires dans les maladies cardiovasculaires (UMR Inserm 1011) et dans la caractérisation du potentiel angiogénique des cellules progénitrices et leur capacité à induire le remodelage vasculaire (UMR_S Inserm 1140). La collaboration fructueuse qui existe depuis presque 10 ans entre les partenaires garantit la réussite de ce projet translationnel ambitieux, à l'interface entre la recherche fondamentale et clinique, 3) l'association d'études sur des échantillons humains et des modèles animaux déjà développés dans ces équipes. Notre projet, tout en apportant un éclairage nouveau sur la physiopathologie de la SVA et la dégénérescence des bioprothèses valvulaires, testera une nouvelle approche thérapeutique dans ce contexte ce qui représente un réel défi en terme de santé publique.



COORDINATEUR DU PROJET

Madame Sophie Susen (RECEPTEURS NUCLEAIRES, MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET DIABETE)

L'auteur de ce résumé est le coordinateur du projet, qui est responsable du contenu de ce résumé. L'ANR décline par conséquent toute responsabilité quant à son contenu.



PARTENAIRE

UPDescartes - UMRS 1140 INNOVATIONS THERAPEUTIQUES EN HEMOSTASE
U1011 RECEPTEURS NUCLEAIRES, MALADIES CARDIOVASCULAIRES ET DIABETE

Aide de l'ANR 429 696 euros

Début et durée du projet scientifique : septembre 2018 - 36 Mois



LIENS UTILES

- [Voir la liste des projets sélectionnés](#)
- [Lien permanent vers ce résumé sur le site ANR \(ANR-18-CE14-0014\)](#)
- [Voir les publications dans le portail HAL-ANR](#)

Explorez notre base de projets financés

Votre recherche...



L'ANR met à disposition ses jeux de données sur les projets, [cliquez ici pour en savoir plus](#).



Inscrivez-vous à notre newsletter
pour recevoir nos actualités

[— S'inscrire à notre newsletter](#)

[RGPD](#)

[Plan du site](#)

[A propos de l'ANR](#)

[Mentions légales](#)

[Nous rejoindre](#)

[Les projets financés](#)

→ Nous contacter



Annexe 5 : Communication au congrès de l'European Society for Surgical Research (ESSR) : programme et présentation PowerPoint

EUROPEAN SOCIETY FOR SURGICAL RESEARCH CONGRESS



LILLE FRANCE 29 - 30 JUIN 2023
www.essr.surgery



June, 29, 2023

08:45 am 10:15 am	Hernia Surgery	Case-Based Learning	Surgical Oncology	Urology
10:15 am 10:40 am	Coffee Break			
10:45 am 11:15 am	OPEN CEREMONY and LIFETIME ACHIEVEMENT			
11:15 am 12:45 pm	Colorectal surgery	From Bedside to Classroom	Organ preservation and Transplantation	Integrating new technology into surgical practice
12:45 pm 02:10 pm	Lunch Break			
02:15 pm 04:00 pm	Walter Brendel / Best experimental study session			
04:00 pm 04:25 pm	Coffee Break			
04:30 pm 06:30 pm	Orthopedic, spine and neurosurgery	Experimental Models In Research		Cardiac, Vascular And Thoracic Surgery

June, 30, 2023

08:45 am 10:30 am	Hepato-Pancreato-Biliary surgery	Teaching Through Cases	Emergency and Trauma surgery	Surgical Innovation And Education
10:30 am 10:55 am	Coffee Break			
11:00 am 12:30 am	Obstetrics and Gynecological surgery	Robotic Surgery with TROGS society		Cell therapy, Cell and Islet Transplantation
12:30 pm 01:55 pm	Lunch Break			
02:00 pm 03:30 pm	Metabolic Bariatric ans Upper GI Surgery with TUGSS society	Surgical Video session		
03:30 pm 03:55 pm	Coffee Break			
04:00 pm 04:30 pm	AJCV and CNJC session «My research in 180 sec»			
04:30 pm 05:45 pm	Best clinical study session			
05:45 pm 06:15 pm	CLOSING CEREMONY AND AWARDS			

JUNE, 29, 2023**08:45 am - 10:15 am****Salle des Congrès****Hernia Surgery**

08:45 Laparoscopic transabdominal preperitoneal approach for recurrent inguinal hernia: a randomized trial

ALY SABER, Egypt

08:57 Risk factors for bowel resection in patients with incarcerated inguinal hernia. Retrospective clinical study

TURGUT DONMEZ, Turkey

09:09 The effect of laparoscopic hernioplasty versus lichtenstein tension-free repair on testicular blood flow in inguinal hernia patients. A randomized control study

AHMED EZZAT ELGHRIEB MOUSTAFA, Egypt

09:21 Quantitative evaluation of the abdominal wall mechanical behavior by a new connected abdominal binder: a preliminary study

THIERRY BEGE, France

02:15 pm - 04:00 pm **Salle des Congrès**

Walter Brendel / Best experimental study session

- 02:15** Keynote lecture
RENE TOLBA, Germany
- 02:40** Innovative concepts towards intra-arterial photodynamic therapy
SABRINA HOUTHOOFD, Belgium
- 02:52** Pulmonary valve replacement under cardiopulmonary bypass in the juvenile sheep, tips and tricks in a fragile model
JEROME SOQUET, France
- 03:04** Long-term in-vivo study of the growth of a pedicled fat flap in a tissue engineering chamber
GUILLAUME LACROIX, France
- 03:16** Experimental impact of pushing effort and frequency on fetal sheep ph variation
LOUIS GALAN, France
- 03:28** Feasibility of personalized tumor organoids culture from non-metastatic colorectal cancer and preliminary study of their interest in the management of adjuvant chemotherapy.
CHARREAU QUENTIN, France
- 03:40** Evaluation of effectiveness of targeted photodynamic therapy using a vectorized photosensitizer coupled to folic acid in an ovarian cancer model
MARGAUX MERLIER, France

04:00 pm - 04:25 pm **Coffee break**

04:30 pm - 06:30 pm **Salle des Congrès**

Orthopedic, spine and neurosurgery

- 04:30** Early aseptic tibial loosening in total knee replacement – a gender and obesity related complication
JASMEET JHAJ, United Kingdom
- 04:42** Does the introduction of a daily middle-grade ward round improve mortality and length of stay in hip fracture patients? A large single-centre series at the United Kingdom's top performing trust
JASON MAVROTAS, United Kingdom
- 04:54** Management of neck of femur fractures in a uk major trauma centre, a difficult balance: patient outcomes and resource considerations
MUTAZ ALSUMADI, United Kingdom
- 05:06** Infection after total knee arthroplasty: bilateral simultaneous vs bilateral staggered vs bilateral staged a prospective observational study
ABHISHEK SHETTY, India
- 05:18** Bacterial study in ruptured and unruptured intracranial aneurysm walls with pcr technique in a french population
TUONG LU, France
- 05:30** Prevalence of hands tumors in a city office practice
ROMAIN BAILLOT, Switzerland
- 05:42** Improving the burden of spinal trauma on orthopaedic services at a district general hospital
LUKE THORNTON, United Kingdom
- 05:54** CMC1 joint arthroplasty: so many implanted, so few documented.
KONSTANTINOS VAKALOPOULOS, Switzerland

04:30 pm - 06:30 pm **Salle des Thèses**

Experimental Models In Research

- 04:30** Development of a model of neonatal analgesia throughout lactation in rats
ISABELLE DUTRIEZ-CASTELOOT, France
- 04:42** Vascular eptfe grafts in a porcine carotid artery model
JAROSLAV CHLUPAC, Czech Republic
- 04:54** Pharmacological prophylaxis of intestinal reperfusion damage
IGNACIO GARCIA-ALONSO, Spain
- 05:06** A simple method for ex vivo parathyroid procurement in mini-pigs.
MEHDI MAANAOU, France

Pulmonary valve replacement under cardiopulmonary bypass in the juvenile sheep, tips and tricks in a fragile model

Authors

Jerome Soquet, Mickael Rosa, Delphine Corseaux, Annabelle Dupont, Alexandre Ung, Bart Staels, Eric Van Belle, Sophie Susen, Francis Juthier

Background

Our team is currently studying bioprosthetic valve degeneration using a juvenile sheep surgical model, which is known to carry a high risk of early postoperative mortality. The aim of the present study is to describe our experience of pulmonary valve replacement (aortic xenograft implanted in pulmonary position) in a juvenile sheep model and to share a few safeguards and pitfalls from a surgical perspective.

Material and Methods

From September 2019 to July 2021, 27 juvenile sheep underwent a pulmonary valve replacement under cardiopulmonary bypass (beating heart) with a fresh porcine aortic valve. In addition, 1 specimen served as a sham. Median weight of sheep and pigs were 23 kg (21.6 – 24.7) and 21 kg (19.7 – 24) respectively. Median diameter of implanted porcine valves was 14 mm (14 – 15). Early mortality was defined as death within 30 days following the procedure. An autopsy was systematically performed in cases of early death. The cohort was divided into 2 groups: the Early Group (first 14 specimens) vs the Late Group (last 14 specimens).

Results

The 2 groups had similar morphological characteristics (weights and implanted valve diameters). The early death rate differed significantly between the 2 groups: 50% (7/14) in the Early Group vs 14% (2/14) in the Late Group ($p = 0.043$). Causes of early deaths were: bleeding ($n = 3$), iatrogenic ($n = 2$), presumed arrhythmia ($n = 2$), respiratory failure ($n = 1$) and cerebral malperfusion ($n = 1$). Of note, there was no early mortality in the last 12 consecutive specimens.

Measures taken to improve postoperative outcomes were: (1) to switch cardiopulmonary bypass priming solution from sodium chloride 0.9 g/L to Lactated Ringer's, (2) to administer potassium chloride 1g/L of priming solution at the start of the cardiopulmonary bypass, (3) to administer calcium chloride 1 g just before coming off bypass, (4) to administer 1 mg adrenaline boluses after coming off bypass when necessary, (5) to decrease the size of the venous cannula down to 26 Fr, (6) to systematically insert a nasogastric tube before the procedure to relieve pressure on the lungs by emptying the stomach, (7) to transcutaneously puncture the stomach in case of peroperative distension and (8) to postpone the first transesophageal echocardiography (performed under general anesthesia) to the second week after the operation (versus the first week).

Discussion and Conclusion

Pulmonary valve replacement potentially remains a high-risk procedure in juvenile sheep. Tissues are fragile and prone to bleeding. In our experience, results were drastically enhanced by measures aimed at improving postoperative cardiac function, avoiding arrhythmias, optimizing the respiratory status and favoring recovery before the performance of an invasive procedure under general anesthesia.



Pulmonary valve replacement under cardiopulmonary bypass in the juvenile sheep

Tips and tricks in a fragile model

Jerome Soquet, MD

Associate Professor, Consultant Cardiac Surgeon

Director of Pediatric Cardiac Surgery

Conflicts of interest: none

Mickael Rosa, Delphine Corseaux, Annabelle Dupont, Alexandre Ung, Bart Staels, Eric Van Belle, Sophie Susen, Francis Juthier





You are welcome to share details of this presentation responsibly and with due credit on social media.



BACKGROUND

Aortic valve stenosis

- Most frequent valvular heart disease
- Surgical or transcatheter valve replacement mostly with bioprosthetic valve



Bioprosthetic valves

- Bovine pericardium, porcine aortic root
- **Deterioration** → Surgical or transcatheter valve-in-valve replacement
- Mortality, morbidity

UMR 1011 - Team 2

- Aortic valve calcification, bioprosthetic valve deterioration
- Slow-down bioprosthetic valve deterioration



BACKGROUND

Animal models of accelerated valve calcification

- Pulmonary valve replacement in a juvenile sheep model (aortic xenograft)
 - Juthier et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2006
 - Vincentelli et al. J Thorac Cardiovasc Surg 2007
- Other models: mouse, rat, rabbit

Issues

- High mortality rate in our early experience of pulmonary valve replacement in the juvenile sheep model
- Lack of disclosure in other studies

Objectives

- To describe our experience
- To share safeguards and pitfalls from a **surgical perspective**



MATERIALS & METHODS

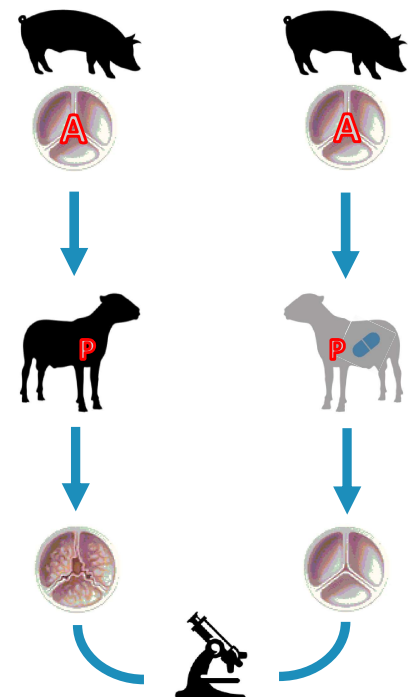
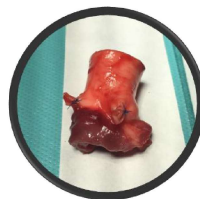
From September 2019 to July 2021

28 juvenile sheep

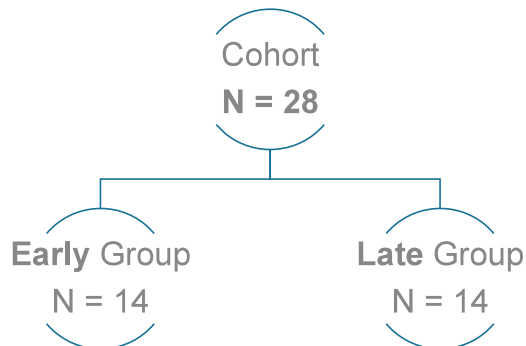
- Weight = 23 kg (21.6 – 24.7)
- N = 27 pulmonary valve replacement under cardiopulmonary bypass
- N = 1 sham

27 pigs

- Weight = 21 kg (19.7 – 24)
- Aortic valve diameter = 14 mm (14 – 15)
 - → **Aortic xenografts**



MATERIALS & METHODS



Early mortality: death $\leq$ 30 days following the procedure

- Systematic autopsy

Statistical analysis

- Chi-squared test
- Significance: $p < 0.05$
- IBM SPSS 21

Ethics committee approval

APAFIS #20512-201904291301750



MATERIALS & METHODS: PROTOCOLE

Anesthesia

- Premedication (ketamine, xylazine)
- Antibioprophylaxy (cefazoline)
- **General anesthesia**, oral intubation
 - Isoflurane $\rightarrow$ propofol (CPB) $\rightarrow$ isoflurane
- Venous +/- arterial line, gastric tube
- Analgesia (buprenorphine)
- Myorelaxation (rocuronium)

Surgery

- Porcine aortic valve harvesting
- Left-sided thoracotomy (3rd ICS)
- **Cardiopulmonary bypass**
 - Right atrium – ascending aorta
 - Beating heart
- Pericardial window, left pleural drain (dry suction)

Postoperative course

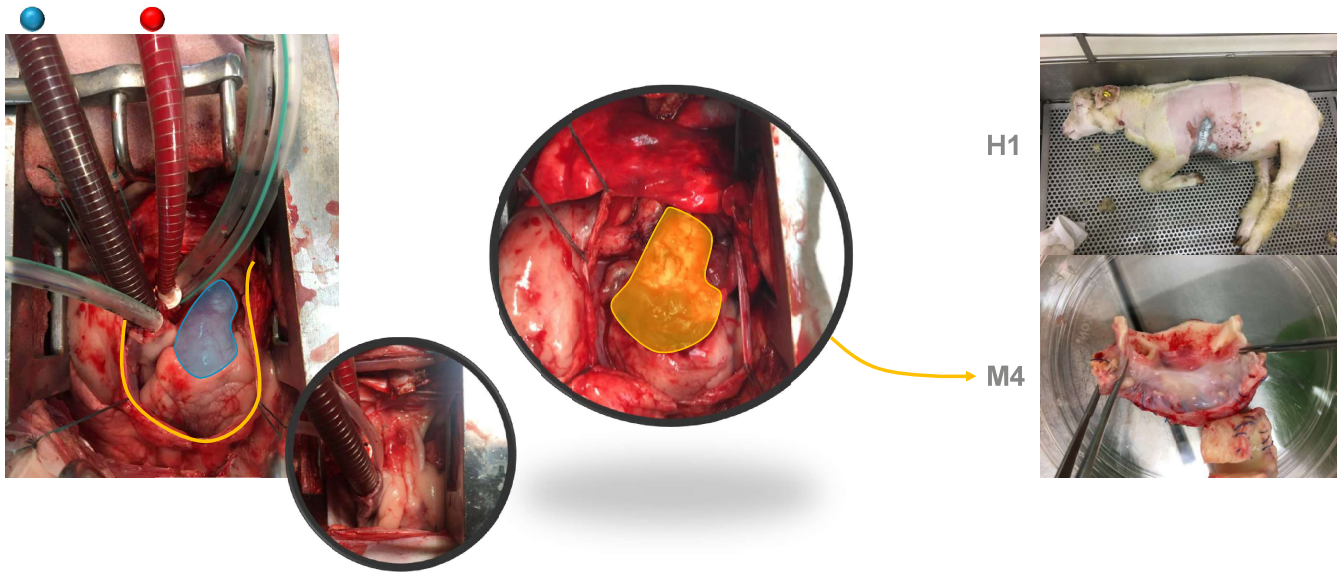
- Extubation & drain removal H1
- Feeds POD1
- Antibiotics (cefazoline) & anticoagulation (enoxaparine) until POD7

Analyses

- Clinical monitoring
- Bloods
- Echocardiography (POW1, M1, M2, M3, M4)
- Aortic xenograft **harvesting at 4 months**
 - Histology
 - Immunohistochemistry
 - Protein expression (Western blot)



MATERIALS & METHODS: PROTOCOL



RESULTS

The 2 groups were comparable (same weight and implanted valve diameters)

Early death rate: Early Group 50% (7/14) vs 14% (2/14) Late Group, $p = 0.043$

Causes of early death

- Bleeding, $n = 3$
- Iatrogenic, $n = 2$
- Presumed arrhythmia, $n = 2$
- Respiratory failure (gastric distension), $n = 1$
- Cerebral malperfusion (low cardiac output), $n = 1$



No early mortality in the last 12 consecutive specimens



RESULTS

Medical measures taken to improve postoperative outcomes

Peroperatively

- Switch cardiopulmonary bypass priming solution
 - NaCl 0.9% → **Lactated Ringer's**
- **KCl 1 g/L** of priming solution at the start of cardiopulmonary bypass
- **CaCl₂ 1 g** just before coming off bypass
- Adrenaline 1 mg boluses after coming off bypass when necessary



Postoperatively

- Postpone the first echocardiography (under general anesthesia) to **POW2** (versus POW1)



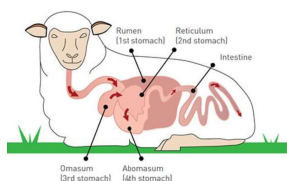
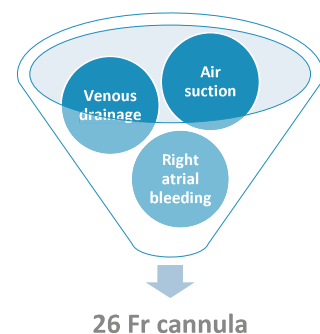
RESULTS

Invasive measures taken to improve postoperative outcomes

Decrease the size of the venous cannula down to 26 Fr

Insert gastric tube systematically

Transcutaneously puncture the "stomach" in case of perioperative distension



CONCLUSION

Pulmonary valve replacement = potential high-risk procedure in the juvenile sheep

Recommendations

- Improve postoperative cardiac function
- Avoid arrhythmias
- Optimize respiratory status
- Favor recovery before performing any invasive procedure under general anesthesia

A call to systematically disclose mortality rate as a primary endpoint in animal studies

- In valve studies: valve-related and non valve-related complications/deaths
- Applicable to other medical devices, drugs etc...

3. Results

Two sheep died during or shortly after the implantation procedure. One died during the operation due to a tear in the pulmonary artery extending distal to the outflow cannula, with rapid exsanguination of the sheep. Another sheep died due to respiratory insufficiency within 6 h after the operation. One sheep died 20 days postoperatively due to endocarditis of the tricuspid valve and the bioprosthetic valve in pulmonary position. One sheep died 28 days postoperatively, with necropsy showing pneumonia without evidence of endocarditis. These four sheep were replaced by new experiments and excluded from the study. **Global mortality was thus 28%**



Thank you !

