



HAL
open science

Ingénierie tissulaire de valves cardiaques : apport des techniques de thérapie cellulaire

Francis Juthier

► **To cite this version:**

Francis Juthier. Ingénierie tissulaire de valves cardiaques : apport des techniques de thérapie cellulaire. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00433512

HAL Id: tel-00433512

<https://theses.hal.science/tel-00433512>

Submitted on 19 Nov 2009

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

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

THESE
p`ur `btenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE II

Discipline : Chirurgie Th`racique et Cardi`-vasculaire

Présentée et s`utenue publiquement par
Francis JUTHIER
le 29 septembre 2009

Ingénierie tissulaire de valves cardiaques :
App`rt des techniques de thérapie cellulaire

Directeur de thèse : M`nsieur le Pr`fesseur André Vincentelli

JURY

M`nsieur le Pr`fesseur Jean-N`ël Fabiani, Rapp`rteur

M`nsieur le Pr`fesseur Alain Leguerrier, Rapp`rteur

Madame le Pr`fesseur Brigitte Jude, Examineur

M`nsieur le Pr`fesseur Alain Prat, Président

Plan

I Généralités

- 1.1 Les limites des substituts valvulaires actuellement disponibles
 - 1.1.1 Prothèses mécaniques et complications hémorragiques
 - 1.1.2 Défaillance structurelle des bioprothèses
 - 1.1.3 Le cas particulier des homogreffes aortiques
- 1.2 L'intervention de Ross : résultats et limites
- 1.3 Le concept d'ingénierie tissulaire appliqué aux valves cardiaques
 - 1.3.1 Le choix d'un tissu de soutien
 - 1.3.1.1 Les matrices décellularisées
 - Décellularisation enzymatique
 - Décellularisation à base de détergents
 - 1.3.1.2 L'utilisation de polymères synthétiques biodégradables
 - Polyesters aliphatiques
 - Polyhydroxyalcanoates (PHA)
 - 1.3.2 Le choix du composant cellulaire
 - 1.3.2.1 Cellules différenciées dérivées de vaisseaux humains
 - 1.3.2.2 cellules médullaires stromales (ou mésenchymateuses)
 - 1.3.2.3 Cellules de cordon ombilical, cellules de villosité choriales et cellules de liquide amniotique
 - 1.3.2.4 Progéniteurs endothéliaux circulants
 - 1.3.3 L'utilisation d'un bioréacteur pulsatile
 - 1.3.4 Ingénierie tissulaire de valves cardiaques : résultats cliniques

2 Travaux personnels

- 2.1 Propriétés mécaniques in vivo d'une valve porcine décellularisée
 - 2.1.1 Prélèvement valvulaire et décellularisation
 - 2.1.2 Propriétés mécaniques in vivo dans des conditions de flux systémique
 - 2.1.2.1 Modèle
 - 2.1.2.2 Résultats

- 2.1.3 Propriétés mécaniques in vivo en position de fonction pulmonaire
 - 2.1.3.1 Modèle
 - 2.1.3.2 Résultats
- 2.2 Stratégies d'amélioration de la recolonisation cellulaire
 - 2.2.1 Injection de G-CSF
 - 2.2.1.1 Effet du G-CSF sur les lignées cellulaires sanguines de l'agneau
 - 2.2.1.2 Effets délétères du G-CSF sur les valves décellularisées
 - 2.2.2 Effets de l'injection in situ de cellules médullaires mononucléées (CMM)
 - 2.2.2.1 Devenir des cellules injectées (marquage fluorescent)
 - 2.2.2.2 Effets de l'injection de cellules mononucléées médullaires autologues
 - 2.2.3 Effets de l'injection in situ de cellules souches mésenchymateuses
 - 2.2.3.1 Effets de l'injection in situ de cellules souches mésenchymateuses : résultats
 - 2.2.3.2 Preuve du caractère autologue de la recellularisation
- 2.3 Propriétés biologiques des valves porcines décellularisées : étude préliminaire in vitro
 - 2.3.1 Effet de la décellularisation sur l'immunogénicité de valves porcines
 - 2.3.1.1 Concentration optimale des cellules mononucléées humaines
 - 2.3.1.2 Evaluation de l'immunogénicité des valves décellularisées, méthode
 - 2.3.1.3 Immunogénicité des valves décellularisées, résultats
 - 2.3.2 Effet de la décellularisation sur la thrombogénicité de valves porcines
 - 2.3.2.1 Etude de thrombogénicité, matériel et méthodes
 - 2.3.2.2 Etude de thrombogénicité, résultats
- 2.4 Essai d'implantation transapicale
 - 2.4.1 Modèle d'implantation transapicale
 - 2.4.2 Résultats

3 Articles

- 3.1 Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization : Deleterious effects of granulocytes colony-stimulating factor
- 3.2 In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates?

3.3 Experimental off-pump transventricular pulmonary valve replacement using a self-expandable valved stent: a new approach for pulmonary incompetence after repaired tetralogy of Fallot?

4 Synthèse et perspective

I GENERALITES

1 Généralités

Les techniques chirurgicales autorisant le remplacement valvulaire aortique ont été décrites au début des années 60 par Bahnson et indépendamment par Hufnagel et Conrad[1, 2]. La recherche d'un substitut de remplacement valvulaire idéal et permanent, adapté en particulier aux interventions de remplacement valvulaire chez l'enfant et l'adulte jeune a depuis lors été continue.

Les caractéristiques de ce substitut idéal ont été décrites par Dwight E. Harken dans les années 50 : absence de thrombogénicité et de potentiel immunogène, durabilité, résistance aux infections, et potentiel de croissance et de remodelage, ce qui correspond aux caractéristiques fondamentales des tissus naturels autologues[3]. Les deux grands types de substituts actuellement disponibles (prothèses mécaniques et bioprothèses porcines ou péricardiques bovines) ont cependant encore des limites et inconvénients importants notamment dans le traitement des pathologies valvulaires avant l'âge de 60 ans[4].

1.1 Les limites des substituts valvulaires actuellement disponibles

La littérature actuelle comporte deux grandes études randomisées comparant valves mécaniques et prothèses biologiques, incluant un grand nombre de patients avec des résultats à long terme.

La première est l'étude d'Edimbourg incluant 541 patients opérés entre 1975 et 1979 ayant reçu soit une prothèse mécanique à disque (Björk-Shiley) soit une bioprothèse porcine (Hancock ou Carpentier Edwards) en position aortique ou mitrale[5, 6]. Ses principales conclusions après un suivi moyen de 20 ans sont les suivantes : la survie était identique avec les deux types de valves, le taux de réintervention était plus élevé avec la valve porcine ($67,8 \pm 5\%$ versus $12,2 \pm 2,5\%$ $p < 0,0001$). Ce taux de réintervention était d'autant plus important que les patients étaient jeunes, le risque relatif de réintervention augmentant de 55% par décennie, de façon continue sur l'ensemble de la population étudiée. Les complications hémorragiques graves étaient plus importantes avec la prothèse mécanique qu'avec la prothèse porcine ($40,7 \pm 5,4\%$ versus $27,9 \pm 8,4\%$ $p = 0,008$).

La deuxième étude est l'étude des vétérans réalisée entre 1977 et 1982 comparant les résultats du remplacement valvulaire aortique et mitral par la prothèse mécanique à disque Björk-Shiley à ceux de la bioprothèse porcine de Hancock dans une série de 575 patients[7,

8]. Avec un suivi moyen de 15 ans, les résultats étaient les suivants : la mortalité après remplacement aortique était plus faible avec la prothèse mécanique ($66 \pm 3\%$ versus $79 \pm 3\%$ $p = 0,02$), le taux de réopération était également inférieur ($10 \pm 3\%$ versus $29 \pm 5\%$ $p = 0,004$). On ne rapportait aucun cas de défaillance structurelle de prothèse mécanique. Les bioprothèses présentaient un taux de dégénérescence de $23 \pm 5\%$ en position aortique et de $44 \pm 8\%$ en position mitrale. Ces dégénérescences survenaient essentiellement chez des patients âgés de moins de 65 ans, à partir de 5-6 ans de suivi pour les prothèses mitrales et de 7-8 ans de suivi pour les prothèses aortiques. Il y avait significativement moins de complications hémorragiques avec les bioprothèses. La fréquence des autres complications liées à la prothèse était équivalente entre valve mécanique et bioprothèse en particulier les complications thrombo-emboliques.

Il existe peu de séries de remplacements valvulaires prothétiques ciblées spécifiquement sur les adolescents et adultes jeunes. Tatoulis *et al* ont publié une série de remplacements valvulaires aortiques à l'aide d'une prothèse mécanique (Saint Jude) chez des patients âgés de 15 à 50 ans[9]. Le suivi moyen était de 7,6 ans et était complet. La survie actuarielle était de $93,5 \pm 2,9\%$ à 10 ans et la survie sans événement lié à la valve était de $82,5 \pm 4,5\%$ à 5 ans et de $73,4 \pm 7,9\%$ à 10 ans. Les taux linéarisés de complications (% patient-année) étaient de $0,6 \pm 0,5\%$ pour les complications thrombo-emboliques, de $0,8 \pm 0,2\%$ pour les accidents hémorragiques et de $0,4 \pm 0,5\%$ pour les endocardites sur prothèses.

La principale complication des prothèses mécaniques est donc représentée par les hémorragies liées au traitement anticoagulant alors que la limite essentielle des bioprothèses est la survenue de phénomènes de dégénérescence à long terme.

1.1.1 Prothèses mécaniques et complications hémorragiques

Ce taux d'accidents hémorragiques est particulièrement élevé dans l'étude d'Edimbourg probablement en raison du niveau d'anticoagulation élevé préconisé au moment de l'inclusion des patients.

Dans une revue de littérature reprenant les résultats obtenus dans 95 séries de remplacement valvulaire (37253 remplacements valvulaires mécaniques, suivi cumulé de 187220 valve-années), Grunkemeier rapporte des taux linéarisés d'accidents hémorragiques

compris entre 0,5 et 3,5% patient-années en position aortique et mitrale. Il ne note pas de différence significative en fonction du modèle de valve mécanique utilisé[10-12].

Dans un modèle de simulation élaboré à partir de l'étude de 3934 patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique (prothèse mécanique 27%, bioprothèse 73%), Van Geldorp a pu estimer les risques respectifs de réintervention et d'accidents hémorragiques en fonction de l'âge des patients au moment de l'intervention. Il aboutit à la conclusion qu'un patient âgé de 60 ans subissant un remplacement valvulaire aortique présente respectivement avec une prothèse biologique et une prothèse mécanique un risque de réopération de 25% versus 3% et d'hémorragie de 12% versus 41%. La mortalité observée dans sa base de données étant de 7,3% pour les réinterventions et de 22% pour les événements hémorragiques, il préconise le choix d'une bioprothèse à partir de 60 ans[13].

1.1.2 Défaillance structurelle des bioprothèses

L'analyse des grandes études randomisées et de plusieurs métaanalyses [4, 6, 7, 11, 14-16] fait apparaître que cette défaillance structurelle est essentiellement liée

- au site d'implantation de la prothèse, elle est supérieure en position mitrale
- à l'âge du patient au moment de l'intervention. Dans l'étude de Yun[17], le taux de dégénérescence en position aortique est de 60% à 10 ans, il est supérieur à 90% après 16 ans de suivi dans la tranche d'âge 16-39 ans alors que pour les patients de plus 70 ans, ce taux est inférieur à 15% après 15 ans de suivi.

Ces taux de dégénérescence à 10 ans sont importants (près de 40% en moyenne) lorsque le suivi moyen des patients excède 12 ans. Ils sont équivalents pour toutes les bioprothèses porcines, y compris les bioprothèses porcines sans armature [15, 18, 19].

Colligeant les données issues de 9 études réalisées chez 5837 patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique à l'aide d'une bioprothèse porcine (suivi cumulé de 31874 patients-années), Puvimanasinghe a élaboré un modèle de microsimulation permettant de déterminer le pronostic des patients en fonction de leur âge au moment de l'implantation. Il a ainsi pu déterminer l'espérance de vie ou le risque de réopération attendue pour chaque tranche d'âge. La probabilité de réintervention diminuait rapidement avec l'âge du patient au moment de l'intervention passant par exemple de 63% pour un patient de 35 ans à 11% pour un patient de 75 ans. Pour un homme de 65 ans ce modèle prédit une espérance de vie de 11,3 ans et une probabilité de réintervention de 28% au cours de sa vie[20].

Ce taux de défaillance structurelle semble en revanche moins important pour la prothèse péricardique Carpentier Edwards qui génère in vitro des gradients transvalvulaires inférieurs et un orifice valvulaire plus important [21, 22]. Aupart a par exemple suivi 1133 patients consécutivement opérés d'un remplacement valvulaire aortique avec cette valve. Le suivi moyen était de 5,5 ans. L'âge moyen des patients était de 72,6 ans. Dans cette série, les probabilités d'absence de réintervention et d'absence de dégénérescence de la prothèse étaient de $76 \pm 14\%$ et de $85 \pm 8\%$ [23].

Puvimanasinghe a également réalisé une métaanalyse en reprenant les données de 8 études portant sur des patients opérés d'un remplacement valvulaire aortique à l'aide d'une bioprothèse péricardique Carpentier Edwards (2685 patients, suivi cumulé de 12250 patient-années)[24]. Il en a tiré un modèle de microsimulation permettant à priori de déterminer le pronostic des patients (espérance de vie, survenue de complications liées à la prothèse, taux de dégénérescence de la bioprothèse) en fonction de leur âge au moment de l'implantation. Dans ce modèle, le délai moyen entre l'intervention et une éventuelle réopération pour défaillance structurelle valvulaire allait de 18,1 ans pour un homme de 55 ans à 23,2 ans pour un homme de 75 ans. Pour un homme de 65 ans, l'espérance de vie estimée était de 10,8 ans, l'espérance de vie sans évènement de 9,1 ans et le risque de réopération pour dégénérescence de la bioprothèse de 17 %.

1.1.3 Le cas particulier des allogreffes aortiques

Les allogreffes valvulaires (ou homogreffes) sont prélevées sur des donneurs humains dans le cadre général de dons d'organes. En fonction de la méthode de conservation, on les divise en homogreffes fraîches et homogreffes cryopréservées. Les premières doivent être implantées dans les 3 semaines qui suivent le prélèvement, les secondes peuvent théoriquement être conservées de façon indéfinie. Elles ne possèdent aucun support prothétique ce qui en fait un matériel de choix pour la chirurgie des endocardites.

L'utilisation des homogreffes aortique cryopréservées a suscité à la fin des années 80 un espoir important en terme de durabilité. O'Brien rapporte ainsi en 1987 les résultats d'une série de 316 remplacements valvulaires aortiques réalisés avec une homogreffe fraîche (groupe 1) dans 124 cas et une homogreffe cryopréservée (groupe 2) dans 192 cas[25]. Les probabilités d'absence de dégénérescence à 10 ans étaient de 89% dans le groupe 1 et de 100% dans le groupe 2. La même équipe publie en 1991 les résultats de cette série avec un

recul supérieur (124 patients dans le groupe 1 et 410 patients dans le groupe). Les probabilités d'absence de « dégénérescence supposée » de l'homogreffe étaient à 14 ans de 51% dans le groupe 1 et de 85% dans le groupe 2[26].

Malheureusement, les résultats tardifs ont objectivés des taux de dégénérescence des homogreffes comparables à ceux des bioprothèses conventionnelles (xéno greffes). Dans la série de O'Brien, les résultats publiés après 29 ans de recul (1022 patients, âge médian 49 ans) sont très variables en fonction de l'âge du patient au moment de l'intervention : les probabilités de réintervention pour défaillance structurelle de l'homogreffe à 15 ans étaient les suivantes

- 53 % pour les patients de moins de 20 ans
- 15% pour la tranche d'âge 21-40 ans
- 19% pour la tranche d'âge 41-60 ans
- 16% pour les patients de plus de 60 ans

Il n'y avait pas de différence significative en fonction du type de préparation et de conservation de l'homogreffe ni en fonction de la technique chirurgicale d'implantation[27].

Une autre étude échocardiographique rétrospective réalisée chez 570 patients porteurs d'une homogreffe aortique (âge moyen 48 ± 16 ans) retrouvait des signes de dysfonction valvulaire dans 72,1% des cas avec un suivi moyen de $6,8 \pm 4,1$ ans. Une sténose valvulaire considérée comme modérée (surface valvulaire : 0,76 à 1 cm², gradient transvalvulaire moyen compris entre 25 et 50 mmHg) était décrite dans 2,5% des cas, une sténose valvulaire sévère (surface valvulaire $\leq 0,75$ cm², gradient transvalvulaire moyen ≥ 50 mmHg) dans 0,7% des cas. Une fuite aortique de grade 2 était mise en évidence dans 10,9% des cas et de grade 3 ou 4 dans 3,9% des cas[28]. Là encore, ces résultats sont comparables à ceux des bioprothèses porcines conventionnelles.

L'utilisation des homogreffes est par ailleurs limitée par une relative pénurie inhérente aux dons d'organes.

La figure 1 représente la probabilité d'absence de défaillance structurelle de 4 types de substituts valvulaires biologiques (bioprothèses porcines en position aortique, bioprothèses porcines en position mitrale, bioprothèses péricardiques bovines en position aortique et homogreffes aortiques) en fonction de leur durée d'implantation (courbe de Weibull).

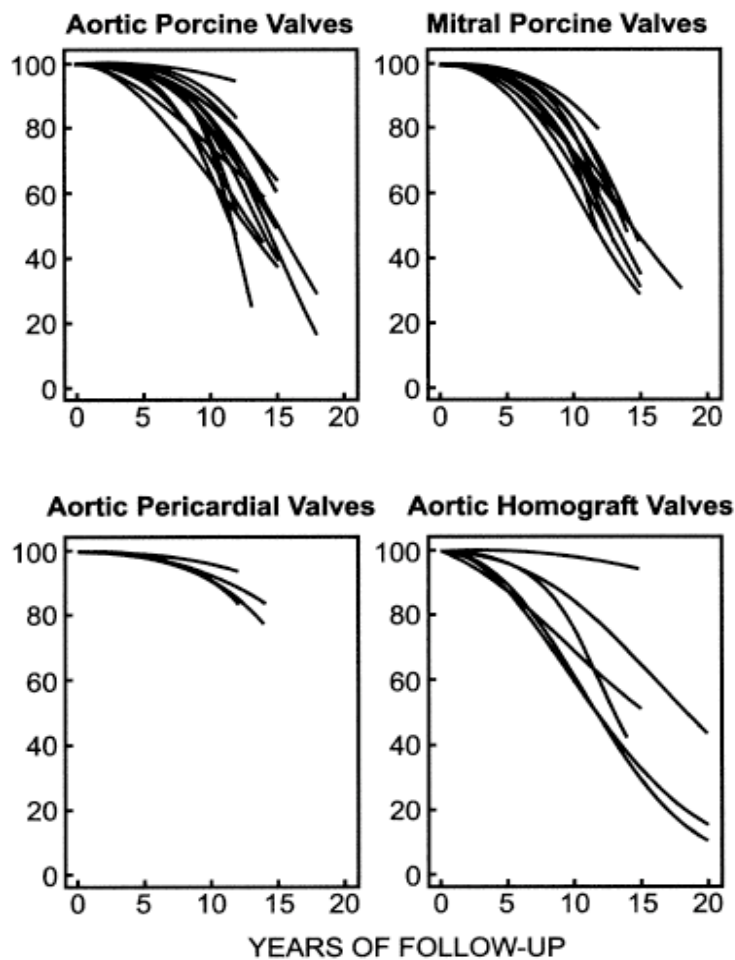


Figure 1 (extrait de Rahimtoola SH et al, J Am Coll Cardiol 2003 ; 41 : 893-904)

Les prothèses mécaniques ainsi que les bioprothèses lorsqu'elles sont implantées chez des adultes jeunes les exposent donc à un risque de complications graves non négligable tout au long de leur vie. Dans le cadre du remplacement valvulaire aortique chez l'enfant et l'adulte jeune, l'intervention de Ross a été proposée comme une alternative à l'utilisation de ces prothèses conventionnelles.

1.2 L'intervention de Ross : résultats et limites

En 1967, Donald Ross développa la technique qui porte aujourd'hui son nom et consiste à exciser la valve aortique pathologique et à transposer la propre valve pulmonaire du

patient (l'autogreffe) en position aortique. La voie d'éjection ventriculaire droite est alors remplacée par une valve biologique, habituellement une valve pulmonaire humaine cryopréservée (homogreffe). La valve pulmonaire autologue dont l'origine embryologique est commune avec celle de la valve aortique semblait remplir à priori toutes les conditions du substitut de remplacement valvulaire idéal :

- Caractère tricuspide et anatomie comparable à celle de la valve aortique
- Viabilité, potentiel de croissance, de remodelage et de lutte contre l'infection
- Caractère autologue évitant une réaction alloimmune
- Biocompatibilité, absence de manifestations thrombo-emboliques
- Performances hémodynamiques optimales.

Cependant, cette technique a été, pendant plus de 20 ans, mal acceptée par la communauté chirurgicale et relativement peu pratiquée. L'auto-transplantation de la valve pulmonaire en position aortique suscitait en effet plusieurs interrogations concernant :

- La complexité technique de l'intervention qui allongeait le temps de clampage, imposait une réimplantation des coronaires, et faisait courir le risque d'une lésion du tronc coronaire gauche et surtout de la première branche septale de l'artère interventriculaire antérieure pendant le temps de prélèvement de la valve pulmonaire.
- Le risque de dysfonction valvulaire aigue de l'autogreffe lié à un éventuel malalignement des sigmoïdes lors de leur implantation.
- La capacité de l'autogreffe à s'adapter dans des conditions de flux systémique et à en supporter les contraintes mécaniques.
- Le risque de dysfonction valvulaire à long terme sur la voie d'éjection ventriculaire droite. Cette intervention s'adressait en effet à des sujets dont l'espérance de vie était de 40 ans et plus et le comportement d'une homogreffe pulmonaire sur de telles durées était inconnu.

La publication des résultats à long terme de la série historique de Donald Ross a été à l'origine au début des années 90 d'un nouvel engouement pour cette intervention.

Dans cette publication [29] de 1997 portant sur les 131 patients survivants opérés entre 1967 et 1984 (âge 11 à 52 ans), les probabilités d'absence d'explantation de l'autogreffe 10 ans et 20 ans après l'intervention étaient de 88% et 85%, les probabilités d'absence d'explantation de l'homogreffe étaient de 89% et 80%. D'autres auteurs ont rapporté des résultats comparables avec un recul supérieur à 10 ans. Les probabilités d'absence d'explantation de

l'autogreffe à 10 ans étaient par exemple de 89% dans la série de Bogers et de 86% dans la série de Kouchoukos[30, 31]. Dans la série d'Elkins qui est la plus importante (487 patients, âge médian 24 ans, extrêmes 2 à 62 ans), la probabilité d'absence d'explantation de l'autogreffe était de $86 \pm 2\%$ à 10 ans et de $74 \pm 5\%$ à 16 ans[32]. Dans toutes ces séries, la première cause d'explantation de l'autogreffe était la dilatation de cette-ci qui s'accompagnait en général d'une régurgitation significative. Un cas de dissection aortique intéressant une autogreffe dilatée et survenant 6 ans après son implantation a également été décrit[33].

En 2009, Takkenberg a colligé les données de 39 séries d'interventions de Ross divisées en séries consécutives, séries adultes et séries pédiatriques. Les probabilités de dégénérescence de l'autogreffe pour ces trois types d'études étaient de 1,15% (séries consécutives) ; 0,78% (séries adultes) et 1,38% patient-années (séries pédiatriques). Les probabilités de dégénérescence de l'homogreffe étaient de 0,91% (séries consécutives) ; 0,55% (séries adultes) et 1,60% patients-années[34]. Dans l'éditorial qui accompagnait cette publication, David, s'appuyant sur ses propres résultats et sur ceux d'Elkins, signalait que l'existence en pré-opératoire d'une insuffisance aortique et d'une dilatation annulaire aortique constituait un facteur de risque de dilatation et de dysfonction ultérieures de l'autogreffe. Pour lui, cette association constitue actuellement une contre-indication à l'intervention de Ross[35].

Tous les types de substituts valvulaires actuellement disponibles pour le remplacement valvulaire de l'enfant et de l'adulte jeune présentent donc des inconvénients importants. De nombreuses études expérimentales ou cliniques incriminent des facteurs immunologiques à médiation cellulaire afin d'expliquer les phénomènes de dégénérescence constatés après l'implantation de bioprothèses allogéniques ou xénogéniques. En particulier les cellules présentes au sein des substituts valvulaires expriment les antigènes d'histocompatibilité de classe I et II[36-38]. Ces constatations ont conduit au développement du concept d'ingénierie tissulaire qui s'applique depuis une dizaine d'années à la recherche d'un substitut valvulaire cardiaque idéal qui serait constitué de tissu viable et autologue doué d'un potentiel de croissance, de réparation et de remodelage[39, 40]. Différentes approches ont été réalisées dans ce domaine et les équipes divergent dans le choix des matériaux à utiliser[41].

1.3 : Le concept d'ingénierie tissulaire appliqué aux valves cardiaques

En 1993, Langer et Vacanti définirent l'ingénierie tissulaire de structures cardio-vasculaires comme un « domaine d'application interdisciplinaire des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie visant au développement de structures biologiques capables de restaurer, maintenir et améliorer les fonctions tissulaires »[39]. En 2005, dans la revue *nature* MacArthur et Orfello décrivent cette spécialité comme la « compréhension des principes de croissance tissulaire et leur application à la production de tissus de substitution en vue d'une utilisation clinique »[42].

L'ingénierie tissulaire de valves cardiaques implique deux composants essentiels, d'une part un tissu de soutien (ou matrice) dont la forme reproduit celle d'une valve humaine native, et d'autre part un composant cellulaire capable à terme de reproduire les fonctions habituelles des cellules valvulaires cardiaques (myofibroblastes au sein de l'interstitium valvulaire et cellules endothéliales à leur surface).

Dans la majorité des cas, la séquence adoptée pour créer une valve cardiaque par ingénierie tissulaire est la suivante (figure 2) :

a / prélèvement de tissus ou de cellules autologues

b/ isolement et sélection des cellules d'intérêt

c/ culture et expansion cellulaire puis ensemencement in vitro du tissu de soutien

d/ conditionnement et maturation dans un environnement biomimétique (bioréacteur)

e/ implantation chez le patient



Figure 2 : Séquence d'élaboration d'une valve cardiaque par ingénierie tissulaire

(Extrait de Schmidt D *et al*, Phil Trans R soc B (2007) 362, 1505-1512)

1.3.1 Le choix d'un tissu de soutien

Ce tissu de soutien doit théoriquement présenter une forme géométrique fonctionnelle et des propriétés mécaniques comparables à celles d'une valve native. Il doit être poreux, non thrombogène et biocompatible afin de favoriser l'ensemencement, la croissance et les interactions cellulaires. Il doit autoriser l'accès et la circulation des nutriments et des signaux inter-cellulaires. Enfin ce tissu de soutien doit être biodégradable, ses molécules devant être résorbées par l'organisme sans réaction inflammatoire cicatricielle.

Deux approches principales ont été utilisées, soit l'utilisation de valves xénogéniques ou allogéniques décellularisées, soit l'utilisation de polymères synthétiques biodégradables.

1.3.1.1 Les matrices décellularisées

Ces matrices décellularisées sont des valves allogéniques ou xénogéniques décellularisées à l'aide de procédés chimiques (détergents) ou enzymatiques. Dans la mesure où la disponibilité des valves allogéniques est limitée, les recherches se sont focalisées sur la décellularisation des valves xénogéniques. Le procédé de décellularisation est capital dans la mesure où l'ensemble des cellules et des débris cellulaires doivent être retirés pour éviter une éventuelle réaction immunitaire cellulaire post-implantation ; à l'inverse ce procédé doit préserver les composants structurels de la matrice extra-cellulaire afin de conserver ses propriétés mécaniques et d'autoriser un ensemencement cellulaire ultérieur. Dans leur environnement physiologique, les protéines matricielles extra-cellulaires (collagène, élastine et glycosaminoglycanes) sont en permanence synthétisées par les fibroblastes et dégradées par les métalloprotéinase matricielles[43]. Ces protéines possèdent des épitopes de surface spécifiques de récepteurs d'adhésion cellulaire facilitant la repopulation par des cellules tissu-spécifiques mais également par des cellules inflammatoires[44, 45]. Dans la mesure où tous les composants cellulaires ont été retirés, l'immunogénicité propre des protéines extra-cellulaires est réputée être minime[46].

Plusieurs modes de décellularisation ont été proposés, les plus fréquents sont la décellularisation enzymatique et la décellularisation à l'aide de détergents.

Décellularisation enzymatique

Différents protocoles ont été décrits mais le principe de décellularisation varie peu. Il consiste à placer les valves fraîches dans une solution d'EDTA 0,02% et de trypsine 0,05% à

37°C sous agitation constante pendant 24 ou 48 heures. Certaines équipes ajoutent également des enzymes nucléasiques RNase 20µg/ml et DNase 0,2mg/ml. Cette digestion enzymatique est suivie d'une phase de lavage dans du PBS pour retirer les débris cellulaires.

Ce type de protocole a été utilisé *in vitro* par Schenke-Layland [47] : des valves pulmonaires porcines étaient décellularisées puisensemencées à l'aide de myofibroblastes et de cellules endothéliales autologues et cultivées en bioréacteur pendant 16 jours, la décellularisation était complète, l'analyse biochimique objectivait une augmentation constante de la masse cellulaire et du contenu en collagène et élastine.

L'équipe de Steinhoff a également testé ce protocole *in vitro* et *in vivo*[48] : des valves pulmonaires ovines décellularisées étaientensemencées successivement avec des myofibroblastes puis des cellules endothéliales autologues et implantées en position pulmonaire chez l'agneau ; après 3 mois d'implantation, la fonction valvulaire était normale, l'histologie proche de celle des valves natives avec une complète endothélialisation. La même équipe reconnaîtra cependant plus tard que ce protocole de décellularisation entraîne une fragilisation tissulaire contre-indiquant son utilisation en position systémique[49].

La valve porcine « Synergraft » a été la première valve décellularisée d'origine xénogénique testée chez l'homme. Le mode de décellularisation était enzymatique. Les résultats expérimentaux étaient prometteurs *in vivo* et *in vitro* chez l'animal avec jusqu'à 1 an après l'implantation une hémodynamique très satisfaisante, une reconstitution morphologique *ad integrum* et une absence de calcifications. Les premières implantations chez l'enfant en position pulmonaire ont cependant été très décevantes puisque une détérioration structurelle très précoce (7 jours) a été mise en évidence. Celle-ci a été rapportée à une décellularisation incomplète conduisant à une inflammation et à des calcifications précoces (2 jours)[50].

Décellularisation à base de détergents

Plusieurs détergents comme le sodium-dodécyl-sulfate (SDS) ou le sodium-déoxycholate ont été proposés. Booth *et al* ont testé *in vitro* plusieurs protocoles de décellularisation de valves porcines en utilisant un panel de détergents sous différentes conditions de concentration, d'osmolarité et de durée d'incubation. L'ensemble de ces procédés étaient testés en présence d'inhibiteurs des protéases sériques et tissulaires : aprotinine et EDTA. Les auteurs concluaient à la supériorité du protocole associant les effets de solutions hypotoniques et d'un détergent : le SDS à 0,1% ; seule cette association permettait l'obtention d'une décellularisation complète tout en maintenant l'architecture

histologique des tissus et leur contenu en collagène, élastine et glycosaminoglycanes[51]. Les propriétés mécaniques des substituts décellularisés étaient également conservées[52].

Rieder, dans un article paru en 2004, compare également l'efficacité et la tolérance de 3 protocoles de décellularisation : un protocole enzymatique et deux protocoles utilisant des détergents, il conclue à une efficacité moindre du protocole enzymatique mais pose la question d'une possible cytotoxicité cellulaire du SDS 0,1%[53].

Cette toxicité du SDS 0,1% n'est pas retrouvée dans la publication de Wilcox[54]. L'auteur reprend dans cette étude le protocole de décellularisation décrit par Booth et Korossis et met en évidence des capacités d'adhésion et de migration de cellules porcines (fibroblastes et cellules musculaires lisses) satisfaisantes sur cette matrice porcine décellularisée.

L'équipe de Haverich a utilisé un autre détergent, le Triton® pour décellulariser des valves porcines. La matrice obtenue étaitensemencée avec des cellules endothéliales humaines et autorisait la prolifération de celles-ci jusqu'à l'obtention d'une couverture endothéliale complète[44].

L'origine phylogénique de la matrice extracellulaire implantée semble influencer ses propriétés mécaniques ainsi que ses capacités de recolonisation cellulaire, probablement du fait d'une immunogénicité propre à la matrice. Allaire, dans un modèle de greffe artérielle décellularisée constatait une évolution anévrysmale ainsi qu'une infiltration inflammatoire des greffons xénogéniques contrairement aux greffons allogéniques[55, 56].

Rieder a comparé le pouvoir d'attraction de matrices décellularisées humaines ou porcines sur des monocytes humains (reflet de leur potentiel immunologique). Seules les valves allogéniques (humaines) décellularisées ne provoquaient pas d'attraction monocyttaire[53]. Dans la même équipe, Kasimir a souligné le potentiel thrombogénique des matrices décellularisées lorsqu'elles n'étaient pas recouvertes de cellules endothéliales[57].

A l'inverse, Leyh, dans un modèle d'implantation de valves pulmonaires décellularisées chez l'agneau a observé des différences histologiques majeures en fonction de l'origine des matrices décellularisées : les matrices allogéniques présentaient des calcifications importantes sans reconstitution de tissu interstitiel, alors que les matrices xénogéniques porcines ne se calcifiaient pas, étaient recolonisées et régénéraient leur tissu interstitiel. L'auteur concluait à l'intérêt de ces matrices porcines en ingénierie tissulaire[58].

1.3.1.2 L'utilisation de polymères synthétiques biodégradables

Le tissu de soutien synthétique idéal devrait avoir une porosité d'au moins 90% et présenter un réseau poreux interconnecté pour permettre la croissance et l'apport de nutriments cellulaires ainsi que l'élimination des métabolites[59]. Deux familles de polymères biodégradables ont été testés : les polyesters aliphatiques et les polyhydroxyalcanoates.

P`lyesters aliphatiques

Il s'agit d'esters de polyglactine, d'acide polyglycolique (PGA) et d'acide polylactique (PLA). Ces chaînes polymériques se dégradent par hydrolyse des ponts diesters. Leurs produits de dégradation sont éliminés par voie urinaire ou bien entrent dans le cycle de l'acide tricarboxylique. Les premières tentatives de création de sigmoïdes valvulaires par ingénierie tissulaire ont été réalisées à partir de combinaisons de ces polyesters aliphatiques[60-62]. Leur limite essentielle est représentée par une épaisseur importante et une rigidité qui en font des structures peu pliables et ont rapidement limité leur utilisation pour la construction de valves complètes avec trois sigmoïdes.

P`lyhydr`xycan`ates (PHA)

La famille des PHA est constituée de polyesters fabriqués à partir d'hydroxyacides synthétisés sous forme de granules intracellulaires par différentes bactéries. Le polyhydroxyoctanoate [63] ainsi que le poly-4-hydroxybutarate (P4HB) ont été utilisés [64] pour créer des valves tridimensionnelles constituées de 3 sigmoïdes. Ces matériaux possèdent des propriétés thermoplastiques et peuvent être facilement moulés selon la forme souhaitée[65]. Leur inconvénient principal est la lenteur de leur dégradation qui constitue un frein au remodelage des protéines matricielles qui existe physiologiquement in vivo.

Des polymères composites, combinaisons de polyesters aliphatiques et de polyhydroxyalcanoates ont finalement été testés et retenus[66]. En particulier, l'utilisation de PGA recouvert de P4HB permet d'associer la porosité du PGA et la thermoplasticité du P4HB et d'obtenir un tissu de soutien qui s'est avéré prometteur in vitro et in vivo dans un modèle ovin[67, 68]. Dans cette série de manipulations, l'équipe de Hoerstrup a fabriqué une valve à partir du polymère composite PGA/P4HB et l'aensemencée de façon séquentielle avec des myofibroblastes et des cellules endothéliales autologues. Ces valves étaient cultivées 14 jours en bioréacteur puis implantées chez 6 agneaux en position pulmonaire et explantées après 1

jour, 4, 6, 8, 16 et 20 semaines. Les échocardiographies répétées objectivaient des sigmoïdes fines et fonctionnelles. L'examen histologique retrouvait une couverture endothéliale complète, la dégradation du polymère était achevée après 8 semaines, les propriétés mécaniques de la valve explantée et son contenu en cellules et protéines extra-cellulaires étaient comparables à ceux d'une valve native.

La figure 3 met en évidence la porosité importante du polymère composite PGA/P4HB avant son ensemencement

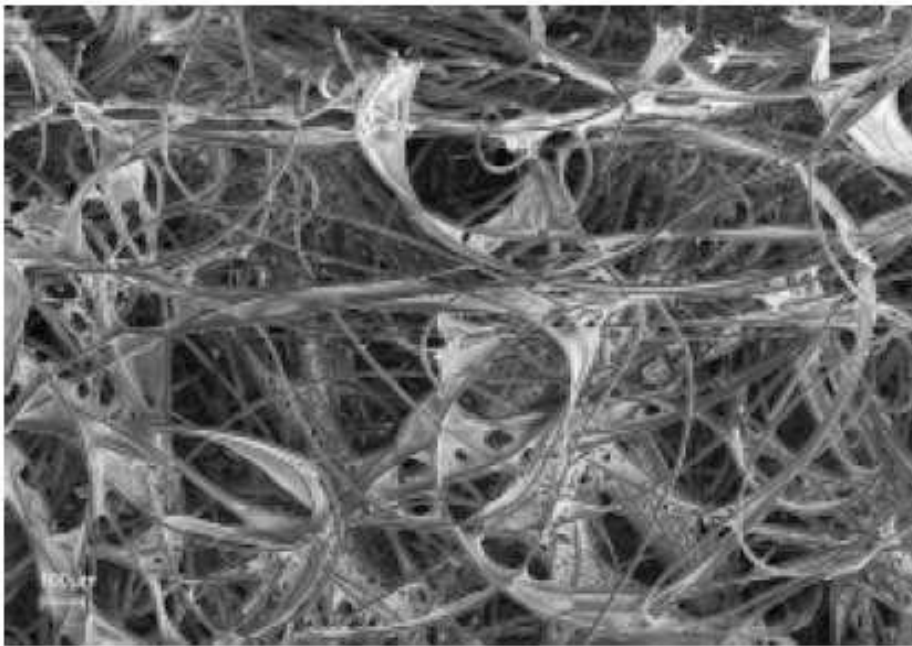


Figure 3 : polymère PGA/P4HB en microscopie électronique (extrait de Schmidt D et al, Swiss med wkly 2006 ; 136 :618-23)

1.3.2 Le choix du composant cellulaire

Une fois le tissu de soutien défini, il faut choisir le ou les types cellulaires qui vont servir à initier la recolonisation de celui-ci. Plusieurs sources de matériel cellulaire ont été utilisées pour l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques

1.3.2.1 Cellules différenciées dérivées de vaisseaux humains

Il s'agit de cellules adultes différenciées qui sont les types cellulaires habituellement présents au sein des valves cardiaques : les myofibroblastes et les cellules endothéliales. Ce sont les premières à avoir été utilisées.

Les myofibroblastes et les cellules endothéliales peuvent facilement être obtenues à partir de prélèvements veineux périphériques. De plus le système veineux est peu sujet aux phénomènes d'athérosclérose et de calcification qui peuvent gêner l'isolement cellulaire[44, 69]. Ces cellules peuvent également être obtenues à partir de prélèvements artériels lorsqu'il existe un réseau de suppléance. (par exemple prélèvement d'artère radiale) Leur isolement et leur culture in vitro sont aisés [70] et l'ensemencement séquentiel de myofibroblastes puis de cellules endothéliales d'origine artérielle sur un tissu de soutien adéquat aboutit à la création d'un tissu organisé en couches superposées[71]. Schnell a comparé les propriétés des myofibroblastes issus de prélèvements veineux ou aortiques et a démontré la supériorité des cellules d'origine veineuse en terme de comportement mécanique et de production de collagène[72].

1.3.2.2 Cellules médullaires stromales (ou mésenchymateuses)

Ces cellules peuvent être obtenues facilement par ponction médullaire, elles ont la capacité de se différencier en plusieurs lignées cellulaires dont les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Perry a isolé des cellules médullaires mononucléées ovines, les a cultivées en milieu de culture mésenchymateux puis ensemencées sur un polymère biodégradable et de nouveau cultivées 2 semaines dans un bioréacteur pulsatile. Ces cellules exprimaient après culture à la fois des marqueurs spécifiques des cellules souches mésenchymateuses (marqueur SH2) et des marqueurs spécifiques des cellules musculaires lisses (α -actine, desmine, et calponine). Les propriétés mécaniques du tissu obtenues étaient équivalentes à celles de valves natives. L'auteur concluait à la validité des cellules mésenchymateuses pour l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques [73] Hoerstrup a également expérimenté in vitro l'utilisation de cellules humaines mésenchymateuses pour la fabrication de valves cardiaques. Après culture dynamique, les cellules exprimaient des marqueurs spécifiques de myofibroblastes et étaient capables de synthétiser du collagène. La quantité de protéines matricielles était cependant inférieure à celle d'une valve humaine et

l'architecture habituelle en trois couches (ventricularis, spongiosa et fibrosa) n'était pas reproduite[74].

1.3.2.3 Cellules de cordon ombilical, cellules de villosité choriales et cellules de liquide amniotique

Les cellules de cordon ombilical sont faciles à prélever et pourraient par le biais de banques cellulaires servir de réserve cellulaire potentielle pour toute la vie d'un individu donné. La gelée de Wharton du cordon ombilical est riche en cellules en cellules souches mésenchymateuses et en progéniteurs endothéliaux. [75, 76]. Ces cellules de cordon ombilical ont été testées in vitro pour une éventuelle utilisation en ingénierie tissulaire de structures cardio-vasculaires, leur capacité de synthèse de protéines extracellulaires était excellente[77-79]. Kadner a par exemple réalisé des patchs tissulaires à partir de myofibroblastes de cordon ombilical, ces cellules avaient un potentiel de croissance remarquable, exprimaient après culture les marqueurs spécifiques des myofibroblastes (α -actine et vimentine) et synthétisaient activement du collagène I et III et de l'élastine.

L'utilisation de cellules issues de villosités choriales prélevées dans le cadre d'une procédure de diagnostic anténatal a également été rapportée. Ces cellules étaientensemencées avec des progéniteurs endothéliaux de sang de cordon ombilical sur un polymère résorbable. Après 28 jours de culture, les valves obtenues présentaient un phénotype cellulaire, un contenu en ADN et en collagène équivalents à ceux de valves natives de nouveaux-nés[80]. La même équipe a enfin utilisé avec succès des cellules progénitrices issues de liquide amniotique afin de fabriquer des sigmoïdes valvulaires. Ces cellules étaient capables d'endothélialiser les sigmoïdes et de synthétiser des protéines matricielles.

1.3.2.4 Progéniteurs endothéliaux circulants

En 1997, Asahara a identifié dans le sang circulant d'adultes une petite population cellulaire de progéniteurs hématopoiétiques mononucléés CD34+ qui ont dévoilé en culture des caractéristiques de cellules endothéliales. Ces cellules, les progéniteurs endothéliaux circulants, sont habituellement sélectionnées en fonction de leurs propriétés d'adhérence en culture en présence de facteurs de croissance endothéliaux. Elles sont capables de remplacer les cellules endothéliales et de promouvoir l'angiogénèse en cas d'agression vasculaire[81,

82]. Leur principal avantage pour une utilisation en ingénierie tissulaire est leur facilité d'obtention à partir d'un prélèvement de sang périphérique et leur plasticité en culture. Leur principal inconvénient est représenté par leur faible nombre à l'âge adulte. Ces progéniteurs endothéliaux sont par contre très nombreux dans le sang de cordon ombilical. Ils ont été utilisés avec succès pour la fabrication de vaisseaux de petit diamètre [83]. Les progéniteurs endothéliaux issus de sang de cordon ombilical ont également été cultivés sur un polymère biodégradable et ont démontré leur potentiel d'adhésion, de prolifération et de différenciation[84, 85]. Dans la mesure où un prélèvement de sang de cordon ombilical peut être réalisé pendant la grossesse sous guidage échographique, les progéniteurs endothéliaux circulants pourraient en théorie représenter une source cellulaire disponible à la naissance.

De multiples types cellulaires différenciés ou pluripotents sont donc disponibles pour l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques. De nombreux auteurs insistent cependant sur l'importance de conditions de culture calquées sur l'environnement habituel des valves ce qui impose de reproduire des conditions de flux circulant. Ces conditions peuvent être obtenues grâce à l'utilisation d'un bioréacteur pulsatile[86].

1.3.3 L'utilisation d'un bioréacteur pulsatile

Dans leur environnement habituel, les valves cardiaques sont en permanence soumises à des stimuli biologiques et mécaniques qui interagissent de façon complexe et déterminent le comportement tissulaire [87, 88]. Plusieurs protocoles de conditionnement mécanique in vitro ont été décrits afin de reproduire ces interactions. L'utilisation d'un bioréacteur pulsatile est la méthode la plus fréquemment utilisée pour reproduire et faire varier les conditions de flux, les forces de cisaillement et la tension pariétale. Cet outil autorise les mouvements d'ouverture et fermeture des sigmoïdes de valves obtenues par ingénierie tissulaire dans un milieu de culture déterminé. Il a ainsi été démontré que l'apport conjoint de facteurs de croissance et de stimuli mécaniques pouvait promouvoir le développement tissulaire[89].

La figure 4 représente schématiquement un modèle de bioréacteur pulsatile. Le flux pulsatile est généré à partir d'un système pneumatique. Les conditions de pression et les échanges gazeux sont monitorés.

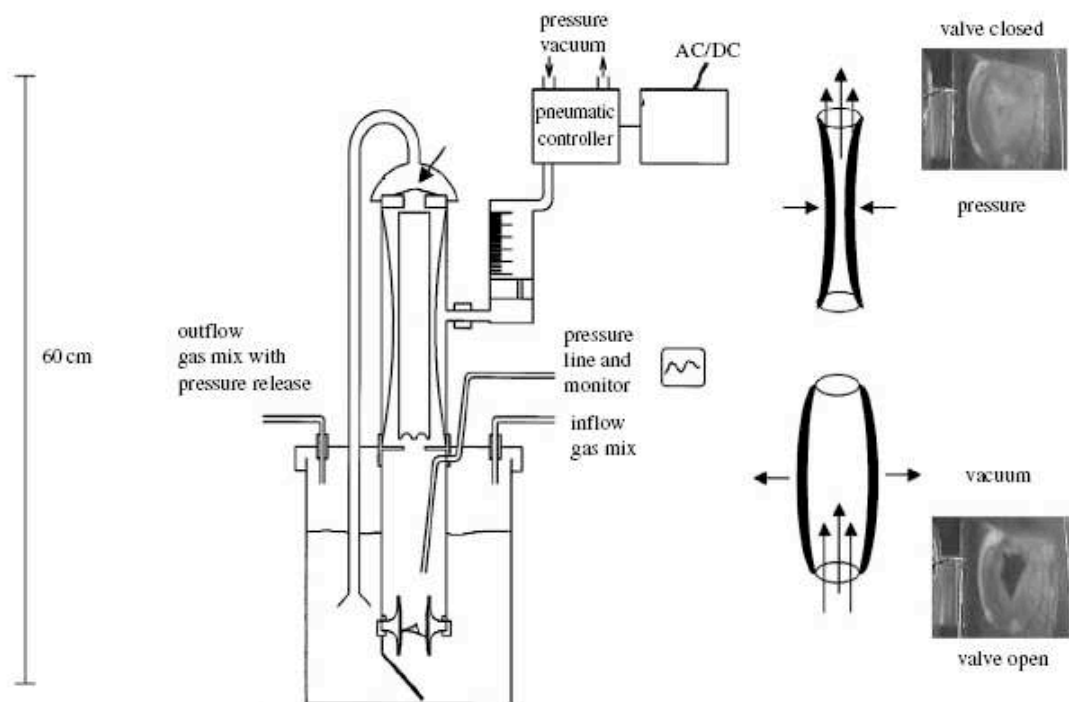


Figure 4 : représentation schématique d'un bioréacteur pulsatile

(Extrait de Schmidt D *et al*, Phil Trans R Soc B (2007) 362, 1505-1512)

Plusieurs équipes ont démontré l'intérêt de ces bioréacteurs dans l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques. La reproduction des forces de cisaillement dans des conditions de culture dynamiques améliorerait les caractéristiques fonctionnelles des cellules endothéliales (interactions cellules-cellules et cellule-matrice, synthèse protéique, production de NO) et déterminait leur structure, leur orientation et leur forme[90-93].

Syedain a également élaboré un modèle de culture en flux pulsatile au cours duquel un étirement progressif des sigmoïdesensemencées était réalisé. Après 3 semaines de préparation, ces sigmoïdes possédaient une résistance à l'étirement et des variations de rigidité comparables à celles de sigmoïdes pulmonaires humaines[94].

Lichtenberg a comparé trois modes de préparation de sigmoïdes décellularisées et réensemencées avec des cellules endothéliales, le premier groupe de valves était cultivé dans des conditions statiques (groupe A), le second dans des conditions de flux progressivement

croissantes (de 0,1 à 0,5 l/mn et à 20 battements/mn ; groupe B) et le dernier dans des conditions de flux élevées d'emblée (de 0,7 à 2 l/mn et à 50 battements/mn ; groupe C). Après 5 jours de conditionnement, il existait une couverture endothéliale complète dans le groupe B (flux modéré), très partielle dans le groupe A (culture statique) et on constatait dans le groupe C (flux élevé) de larges plages acellulaires. De même l'activité métabolique cellulaire était significativement plus élevée dans le groupe B (flux modéré). Les auteurs pensaient que certains résultats décevants obtenus après culture statique étaient liés à l'arrachement des cellulesensemencées lorsque celles-ci étaient soumises brutalement in vivo à des conditions de flux physiologiques[95].

1.3.4 Ingénierie tissulaire de valves cardiaques : résultats cliniques

Très peu d'études cliniques sur l'utilisation de prothèses valvulaires cardiaques obtenues par ingénierie tissulaire ont été publiées. Quelques résultats à court et moyen terme ont cependant été rapportés.

L'équipe de Dohmen a pour la première fois utilisé avec succès en 2000 une allogreffe pulmonaire cryopréservée puis décellularisée etensemencée avec des cellules endothéliales autologues pour reconstruire la voie d'éjection ventriculaire droite au cours d'une intervention de Ross[96]. Cette équipe a publié récemment les résultats à moyen terme obtenus chez 23 patients ayant subi cette intervention avec une valve décellularisée[97]. Ils ont reconstruit la voie droite dans 11 cas avec une allogreffe cryopréservée (Cryolife Inc, Kennesaw GA) puis décellularisée et dans 12 cas avec une valve pulmonaire porcine décellularisée. La décellularisation était réalisée à l'aide d'un détergent, l'acide déoxycholique. Les valves étaient ensuite enduites de Pronectine F (PAA, laboratoires GmbH, Coelbe, Allemagne) puisensemencées à l'aide de cellules endothéliales autologues qui avaient été isolées 2 à 4 semaines plus tôt à partir d'un prélèvement veineux (veine céphalique ou saphène interne). Elles étaient enfin cultivées en bioréacteur pulsatile avant d'être implantées. Les patients étaient évalués par échocardiographie et tomодensitométrie. Le suivi moyen était de $46.0 \pm 12,1$ mois. A 5 ans de suivi maximum, la fonction des valves implantées était satisfaisante sans régurgitation ni sténose. La vitesse transvalvulaire moyenne au dernier contrôle était de $0,9 \pm 0,4$ m/s. Les examens tomодensitométriques ne révélaient pas d'évolution ectasiente, ne mettaient pas en évidence de calcifications ni d'épaississement de la paroi artérielle. Il n'existait pas de différence entre les allogreffes et les xéngreffes décellularisées.

La figure 5 représente l'évolution de la vélocité transvalvulaire moyenne en fonction du temps pour les homogreffes et les xéno-greffes décellularisées dans cette étude.

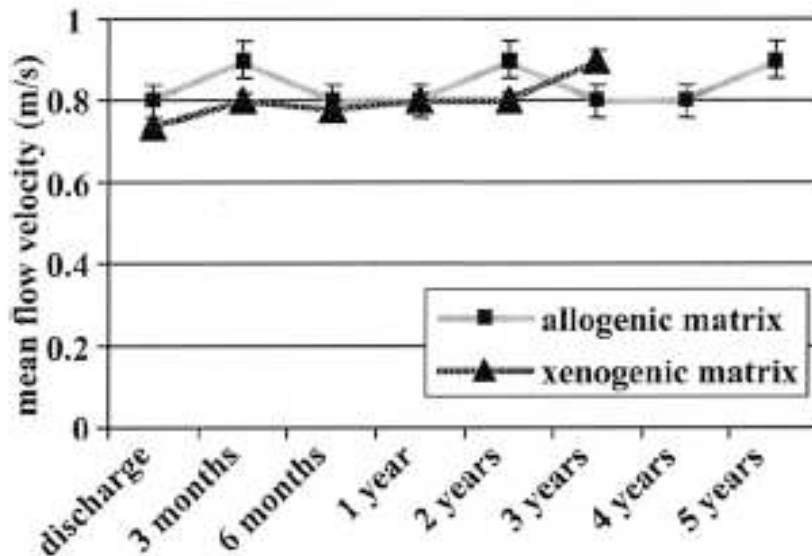


Figure 5 : évolution de la vélocité trans-valvulaire moyenne en fonction du temps (extrait de Dohmen et al, Ann Thorac Surg 2007 ; 84 :729-36)

Un patient de cette étude a par contre dû être réopéré après 4 mois en raison d'une évolution sténosante de sa valve décellularisée. L'aspect tomодensitométrique était celui d'une compression extrinsèque essentiellement développée au niveau de la suture distale. Les auteurs décrivaient lors de la réintervention une prolifération fibreuse et inflammatoire périvalvulaire responsable de cette compression. Cette fibrose tissulaire était retrouvée en histologie.

L'équipe de Simon a publié ses résultats après implantation chez l'enfant de valves porcines décellularisées Synergraft® pour reconstruire la voie d'éjection ventriculaire droite[50]. Il s'agit d'une valve décellularisée selon un procédé enzymatique et implantée sans ensemencement cellulaire préalable. Les résultats expérimentaux avec celle-ci étaient concluants : les propriétés mécaniques in vitro étaient satisfaisantes, son évaluation échographique et hémodynamique in vivo dans un modèle ovin avait mis en évidence un comportement équivalent à celui d'une allogreffe et les valves explantées présentaient une histologie proche de celles de valves natives[98, 99]. Dans cette série, 4 enfants âgés de 2 à 9

ans ont été opérés. Trois ont présenté une dégénérescence majeure de leur valve entre 7 jours et 1 an après implantation et sont décédés, la quatrième valve a été explantée après 2 jours et présentait déjà des phénomènes inflammatoires majeurs. L'analyse histologique des valves explantées mettait en évidence une réaction inflammatoire comparable à celle d'un xénorejet, il n'existait pas de repopulation cellulaire et des dépôts calciques étaient retrouvés. Pour les deux valves explantées à 2 et 7 jours, on objectivait de plus une décellularisation incomplète puisque de nombreux débris cellulaires étaient retrouvés au sein de la média artérielle. La figure 6 met en évidence ces débris cellulaires au sein d'une valve explantée précocement.

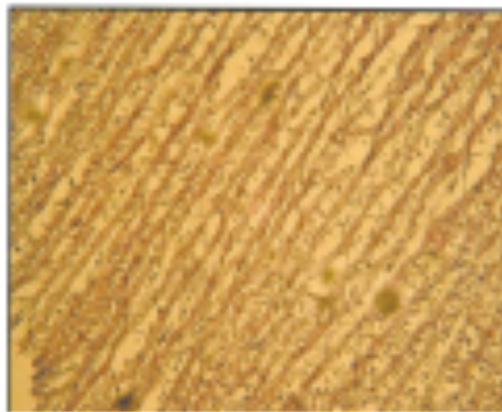


Figure 6 : coupe histologique d'une valve porcine décellularisée explantée précocement
(extrait de Simon P et al, Eur J Cardiothorac Surg 2003 ; 23 :1002-1006)

Les résultats cliniques du procédé de décellularisation Synergraft® étaient en revanche plus satisfaisants lorsque celui-ci était appliqué aux allogreffes pulmonaires humaines. Bechtel rapporte ainsi les résultats d'une série de 33 adultes opérés d'une intervention de Ross pour lesquels la voie d'éjection ventriculaire droite était reconstruite à l'aide d'une allogreffe décellularisée. 49 patients pour lesquels une allogreffe cryopréservée non décellularisée avait été utilisée servait de témoin. Le recul était de 52 mois. Les auteurs ne rapportent aucun décès et aucune réintervention. En post-opératoire immédiat, les performances hémodynamiques des allogreffes décellularisées et non décellularisées étaient comparables. Au dernier contrôle échocardiographique, le gradient transvalvulaire était cependant légèrement supérieur pour les allogreffes décellularisées ($P_{max} 18.2 \pm 9.0$ versus $14.0 \pm 6,9$ mmHg ; $p = 0,049$). L'analyse univariée révélait que la présence d'une allogreffe Synergraft® était le seul facteur prédictif d'augmentation du gradient transvalvulaire[100].

Enfin l'équipe de Haverich a publié ses premiers résultats cliniques après utilisation d'une allogreffe décellularisée et réensemencée à partir de progéniteurs endothéliaux circulants. Deux enfants de 11 et 13 ans ont été opérés avec reconstruction de la voie droite à l'aide d'une allogreffe décellularisée de façon enzymatique. Ces valves étaient cultivées 21 jours en bioréacteur pulsatile après ensemencement cellulaire. Les cellules utilisées étaient issues de prélèvements sanguins périphériques réalisés chez des adultes volontaires, il s'agissait de cellules mononucléées triées par gradient de densité. Elles exprimaient après culture des marqueurs spécifiques de cellules endothéliales (CD 31 et facteur Von Willebrandt). Après 3,5 ans de suivi, le gradient transvalvulaire restait stable chez un patient et diminuait chez l'autre, il n'existait pas d'insuffisance valvulaire et aucun signe de dégénérescence valvulaire n'était noté. Le ventricule droit ne se dilatait pas. De façon remarquable, le diamètre de l'anneau valvulaire pulmonaire augmentait proportionnellement à la surface corporelle des patients.

La figure 7 représente l'évolution du diamètre de l'anneau valvulaire pulmonaire de chacun des deux patients (cercles et triangles) en fonction de la surface corporelle de ceux-ci.

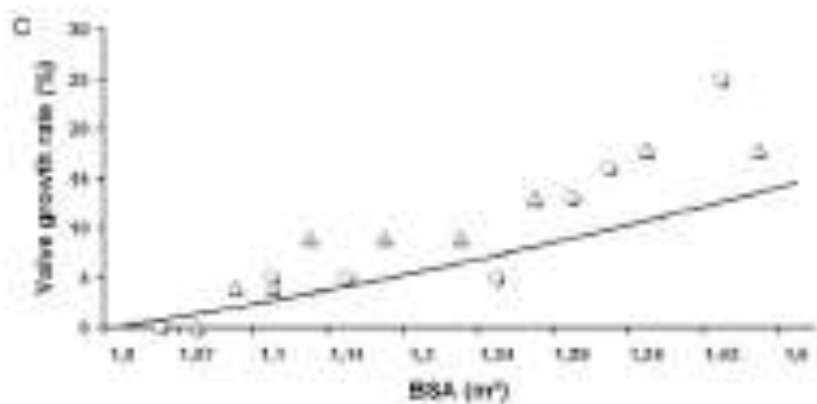


Figure 7 : Corrélation surface corporelle et diamètre de l'anneau valvulaire pulmonaire (extrait de Cebotari S et al, circulation 2006 (suppl I) : I-132-I-137)

Dans ces quelques expériences cliniques, le tissu de soutien utilisé était une allogreffe ou une xéno greffe décellularisée. La valve était implantée avec ou sans phase d'ensemencement cellulaire préalable. Les types cellulaires utilisés étaient soit des cellules endothéliales adultes et différenciées soit des progéniteurs endothéliaux circulants.

Il est intéressant de noter que ces premiers essais cliniques ont été réalisés dans le cadre de remplacements de la voie d'éjection ventriculaire droite, aucune valve obtenue par ingénierie tissulaire n'ayant pour le moment été implantée dans des conditions de flux systémique.

II TRAVAUX PERSONNELS

2 Travaux personnels

Nous avons essayé à partir de 2003 de produire une bioprothèse valvulaire cardiaque par ingénierie tissulaire. Nous avons choisi de travailler à partir de valves porcines décellularisées en raison de leur disponibilité et d'implanter ces valves dans un modèle ovin. L'agneau est en effet le modèle de référence utilisé pour tester la longévité et la fonction des nouvelles bioprothèses valvulaires[101].

Nous avons retenu le protocole de décellularisation décrit par Booth et Korossis à base de solutions hypotoniques et d'un détergent anionique, le sodium dodécyl sulfate, dans la mesure où seule cette association permettait l'obtention d'une décellularisation complète tout en maintenant l'architecture histologique des tissus et les propriétés mécaniques in vitro des substituts décellularisés[51]. Aucune étude n'avait alors été réalisée sur la biocompatibilité des valves obtenues à l'aide de ce protocole ni sur leur comportement mécanique in vivo. L'originalité de nos travaux a résidé dans la tentative d'obtenir une recolonisation cellulaire effective in vivo sans phase d'ensemencement et de culture cellulaire préalable in vitro et à partir de cellules médullaires. L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses dans cette application n'avait alors pas été décrite.

Nous nous sommes appuyés pour promouvoir cette recolonisation cellulaire sur les concepts de « homing » et de « niche cellulaire » qui venaient d'être décrits : la moelle osseuse est la source de cellules souches ayant la possibilité de circuler et de se loger dans différents organes (homing) sous l'influence de nombreux facteurs (molécules d'adhésion, matrice extracellulaire, facteurs de croissance), l'ensemble formant une « niche » dont la nature varie selon les organes[102, 103].

Nous avons commencé par tester le comportement mécanique in vivo de valves porcines décellularisées selon le protocole décrit par Booth et Korossis, dans des conditions de flux systémique et pulmonaire.

2.1 Propriétés mécaniques in vivo d'une valve porcine décellularisée

2.1.1 Prélèvement valvulaire et décellularisation

Les substituts valvulaires étaient prélevés à partir de porcelets femelles de race Large white/Landras pesant 10 à 15 kg.

Les porcs étaient prémédiqués par kétamine 250 mg (Kétalar®) et midazolam 10mg (Hypnovel®) en intramusculaire. Un cathéter veineux de 18 G était mis en place au niveau auriculaire. Les animaux étaient anesthésiés par une injection de propofol 20 mg/kg (Diprivan®) et de sufentanyl 1µg/kg (Sufenta®) puis euthanasiés par une injection intraveineuse de KCl (KCl aguettant 15% 10 ml-1 ampoule).

Le prélèvement cardiaque était effectué sous stricte asepsie chirurgicale par sternotomie médiane et les valves aortiques et pulmonaires étaient disséquées en emportant une collerette myocardique ainsi que les premiers centimètres de la racine aortique et de l'artère pulmonaire.

Ces valves étaient ensuite calibrées à la bougie de Hegar, pesées, puis conditionnées et décellularisées.

Nous avons utilisé le protocole de décellularisation suivant, dérivé des travaux de Booth et Korossis. Il combine les effets d'une solution hypotonique et d'un détergent anionique : le sodium dodécyl sulfate (0,1%).

-Etape 1 : Transport entre la salle de prélèvement et le laboratoire à température ambiante dans une solution de rinçage contenant du PBS + EDTA 0,1 % + aprotinine 10 KIU/ml.

-Etape 2 : Incubation 14 heures à 4°C dans une solution hypotonique pH 8 contenant du tampon Tris 10 mM, de l'EDTA 0,1 % et de l'aprotinine (10 KIU/ml).

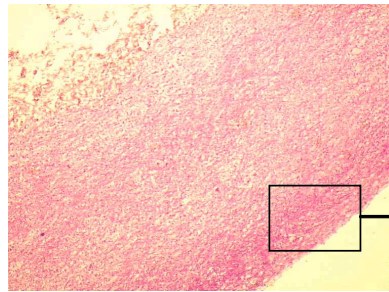
-Etape 3 : décellularisation pendant 24 heures à température ambiante et sous agitation constante dans une solution hypotonique pH 8 contenant du tampon Tris 50 mM + EDTA 0,1% + aprotinine 10 KIU/ml + SDS 0,1%.

-Etape 4 : lavage intensif 3 fois 1 heure à température ambiante et sous agitation constante dans une solution associant PBS stérile + EDTA 0,1% + aprotinine 10 KIU/ml

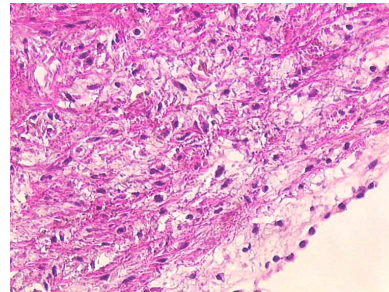
-Etape 5 : stockage dans une solution associant PBS stérile + EDTA 0,1% + Aprotinine 10 KIU/ml + antibiotiques (= Pénicilline 100UI/ml + streptomycine 100 µg/ml + fungizone 2,5UI/ml)

Histologiquement, cette technique de décellularisation permettait d'obtenir une décellularisation complète au niveau des sigmoïdes et presque complète au niveau de la paroi artérielle. De rares noyaux pycnotiques et débris cellulaires restaient cependant présents au sein de la collerette myocardique et dans la partie la plus profonde de la média artérielle.

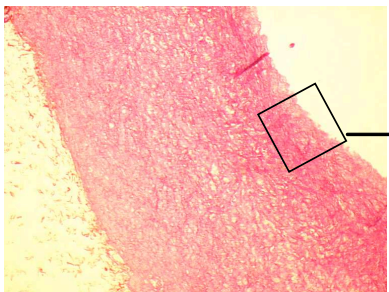
La coloration HES mettait en évidence la persistance de l'architecture habituelle de la paroi artérielle du culot aortique (intima, média et adventice) ainsi que des sigmoïdes (fibrosa, spongiosa et ventricularis).



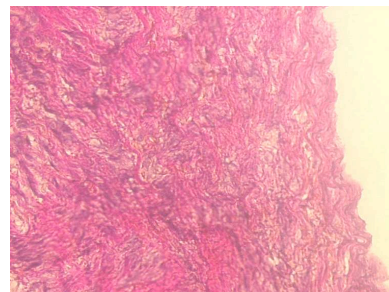
Paroi artérielle non
décellularisée x 25



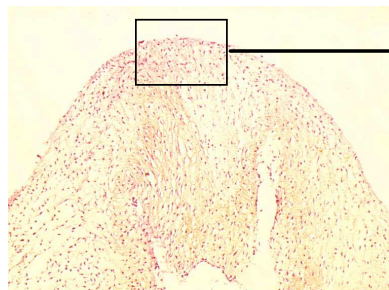
Paroi artérielle non
décellularisée x 200



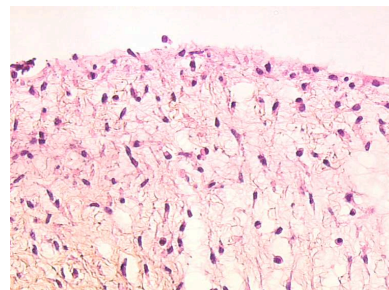
Paroi artérielle
décellularisée x 25



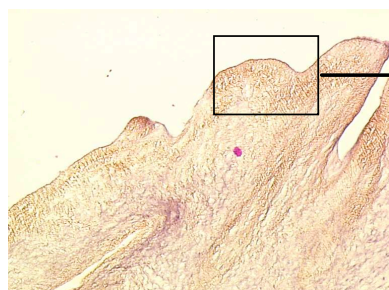
Paroi artérielle
décellularisée x 200



Sigmoïde non décellularisée x 50



Sigmoïde non décellularisée x 200



Sigmoïde décellularisée x 50



sigmoïde décellularisée x 200

Figure 8 : Conséquences histologique de la décellularisation
Coloration HES

La coloration à l'orcéine objectivait une organisation conservée des fibres collagènes. (Figure 8)

Aucune étude sur la résistance in vivo d'une valve décellularisée selon ce protocole n'avait été publiée jusqu'à présent. Nous avons donc développé des modèles permettant de tester in vivo chez l'agneau le comportement hémodynamique de ces valves décellularisées exposées à des conditions de flux systémique puis pulmonaire.

2.1.2 Propriétés mécaniques in vivo dans des conditions de flux systémique

Six animaux ont reçu une valve aortique porcine décellularisée implantée au niveau de l'aorte thoracique descendante d'agneaux. Ces animaux ont été sacrifiés après 3 semaines (n=1), 6 semaines (n=1), 8 semaines (n=1) et 16 semaines (n=3) d'implantation. Une aortographie était réalisée immédiatement avant le sacrifice à la recherche d'une éventuelle évolution sténosante ou anévrysmale.

2.1.2.1 Modèle (figure 9)

Les agneaux étaient laissés à jeun 48 heures avant l'intervention.

La prémédication était réalisée par Kétalar® (250 mg) et Hypnovel® (10 mg) en intramusculaire.

Un cathéter veineux de 14 G était mis en place au niveau jugulaire interne, un cathéter artériel de 20 G était introduit dans une artère auriculaire superficielle et relié à une tête de pression assurant un monitoring continu de la pression artérielle et une sonde nasogastrique était mise en place afin de vider l'estomac.

L'induction était réalisée par Diprivan® (5mg/kg) et Sufenta® (0,3µg/kg) en bolus. L'agneau était ensuite intubé et ventilé en air ambiant. Une antibioprophylaxie peropératoire était instituée lors de l'induction par l'injection de 1g d'amoxicilline + acide clavulanique (Augmentin®). L'anesthésie était entretenue par Diprivan® (15mg/kg/h) et Sufenta® (2µg/kg/h) en perfusion continue.

Le remplissage se faisait à l'aide de solutés cristalloïdes (Ringer lactate® et NaCl 0,09%) et colloïdes (Voluven® et Gélofusine®) de façon adaptée aux pertes sanguines et à l'hémodynamique.

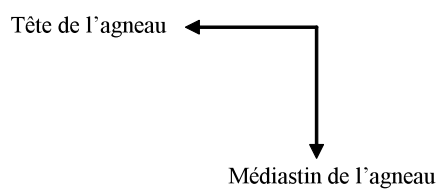
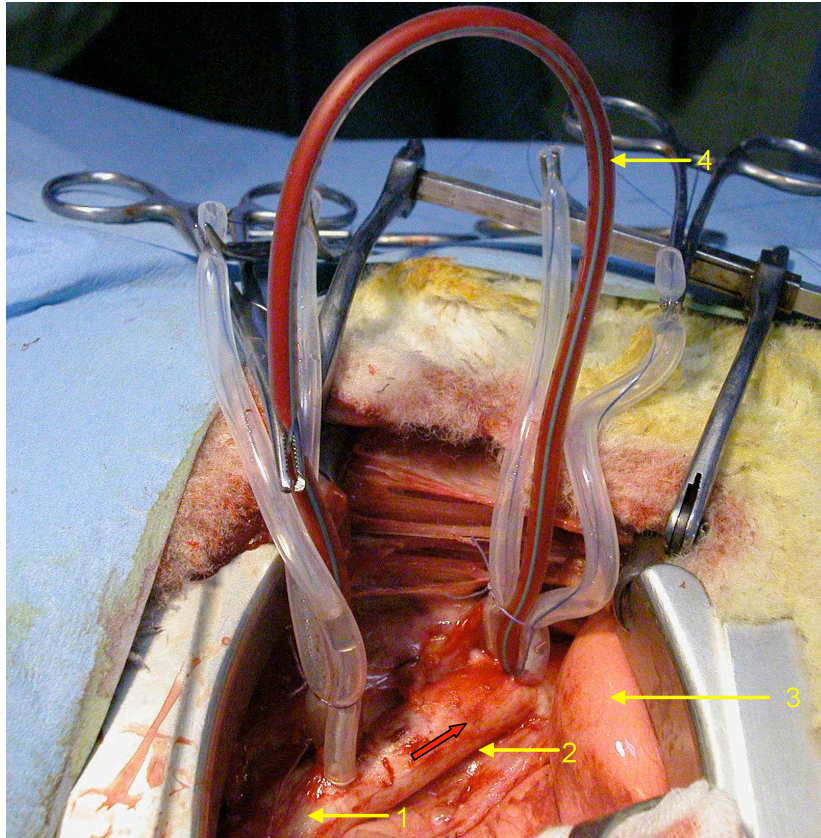


Figure 9 : modèle chirurgical d'implantation en position aortique descendante : photo opératoire après thoracotomie et mise en place du shunt

- 1 aorte thoracique descendante
- 2 site d'implantation de la valve
- 3 poumon gauche récliné
- 4 shunt
- sens du flux artériel

Une injection intraveineuse d'héparine 200 U/kg (Choay) était réalisée avant le clampage aortique et neutralisée après déclampage par une dose équivalente de protamine (Choay).

La survenue éventuelle d'une hypertension artérielle pendant le clampage était contrôlée par l'administration de nicardipine (Loxen®) en bolus de 1mg.

Les agneaux étaient installés en décubitus latéral droit avec mise en place d'un billot sous l'épaule droite.

Une thoracotomie latérale gauche était réalisée dans le 4^{ème} espace intercostal, le poumon gauche était récliné et l'aorte thoracique disséquée sur 5 centimètres immédiatement en aval de l'isthme aortique après ligature de la veine hémi-azygos.

Un shunt passif aorto-aortique était mis en place (sonde nasogastrique de diamètre 14 et bourses de Prolène 4/0®).

L'aorte thoracique descendante était alors clampée, l'aortotomie était réalisée et la valve décellularisée interposée en position thoracique descendante à l'aide de 2 anastomoses termino-terminales (Prolène 4/0®).

Après déclampage, le shunt était retiré, l'hémostase vérifiée et la fermeture était réalisée en 4 plans sur drain thoracique aspiratif. Celui-ci était retiré immédiatement après l'extubation.

2.1.2.2 Résultats (figure 10)

Nous n'avons constaté avec ce modèle aucun cas de rupture, de thrombose ou de dilatation anévrysmale, 3 à 16 semaines après l'implantation. Une étude échocardiographique de la fonction et de l'hémodynamique valvulaire n'était par contre pas réalisable dans ce modèle en absence de création d'une insuffisance aortique sur la valve aortique native car les sigmoïdes de la valve décellularisée ne se ferment pas et ont tendance à se coller contre la paroi aortique.

2.1.3 Propriétés mécaniques in vivo en position de fonction pulmonaire

Dans ce modèle, 6 agneaux ont reçu une valve pulmonaire porcine décellularisée implantée sous circulation entra-corporelle au niveau du tronc de l'artère pulmonaire après destruction de la valve pulmonaire native. Ces animaux ont été sacrifiés après 16 semaines d'implantation. Une échocardiographie trans-thoracique était réalisée 10 jours et 16 semaines après l'implantation. Cet examen comportait la recherche d'un anévrysme, d'une éventuelle régurgitation, une mesure des gradients moyen et maximaux (transvalvulaire et anastomose

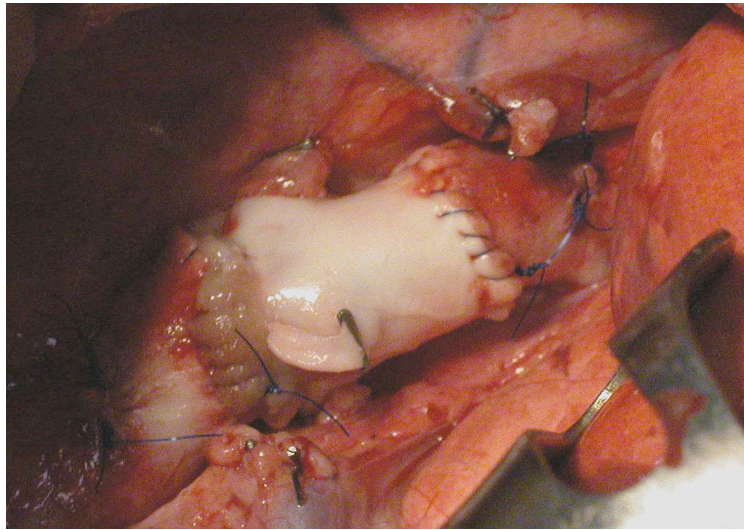
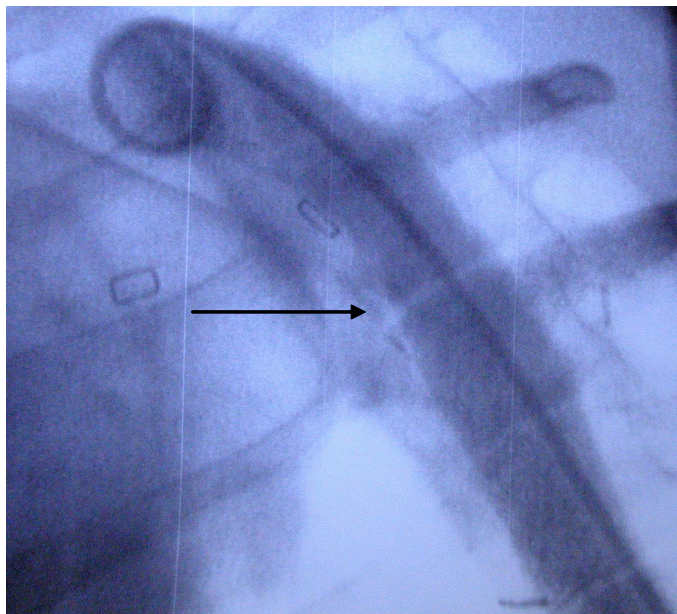


Photo opératoire : pas d'anévrysme ni de déhiscence anastomotique



Aortographie après 16 semaines d'implantation
Flèche = localisation de la valve implantée

Figure 10 : Résistance mécanique des valves décellularisées implantées en position aortique descendante

➔ absence de dilatation anévrysmale dans des conditions de flux systémique

distale), des VTI (chambre de chasse, transvalvulaire), de l'index de perméabilité et de la surface fonctionnelle valvulaire. Une angiographie pulmonaire était également réalisée immédiatement avant le sacrifice.

2.1.3.1 Modèle (figure 11)

L'anesthésie, l'intallation, le cathétérisme et la voie d'abord étaient identiques à ceux du précédent modèle. La circulation extra-corporelle était mise en place entre l'auricule droit et l'isthme aortique, l'artère pulmonaire était libérée sur toute sa longueur. Nous avons utilisé des circuits Dideco Custom Pack® et des oxygénateurs Cobe Optimin®. La CEC était assurée par une pompe à galet (Stockert instrumente®) et les aspirations intracardiaques et intrapéricardiques par une pompe à galets (Sarns®). La valve décellularisée était mise en place à cœur battant, après section du tronc de l'artère pulmonaire et résection des sigmoïdes pulmonaires natives, à l'aide de deux anastomoses termino-terminales de Prolène® 4/0.

2.1.3.2 Résultats

Le comportement hémodynamique de ces valves décellularisées implantées en position de fonction s'est révélé satisfaisant après 16 semaines d'implantation. Nous n'avons constaté aucun cas de rupture ni d'évolution anévrysmale. Il n'existait pas d'insuffisance pulmonaire significative. Les gradients transvalvulaires moyens et maximaux étaient de $2,9 \pm 2,3$ et $5,1 \pm 3,8$ mmHg. L'index de perméabilité était de $0,55 \pm 0,16$ et la surface valvulaire de $1,05 \pm 0,34$.

2.2 Stratégies d'amélioration de la recolonisation cellulaire

L'originalité de nos travaux a été de tenter d'obtenir in vivo une recolonisation cellulaire effective des valves décellularisées à partir de cellules souches autologues d'origine médullaire. Nous avons pour cela testé l'efficacité de deux stratégies de recolonisation cellulaire : soit la mobilisation de ces progéniteurs par des injections de Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF), soit l'injection in situ dans la matrice, immédiatement avant l'implantation, de cellules médullaires mononucléées puis mésenchymateuses.

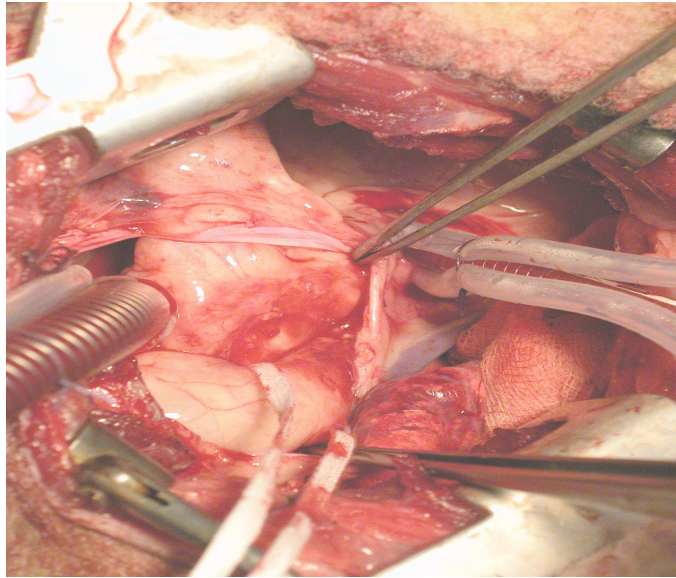


Photo opératoire : mise en place de la circulation extra-corporelle et dissection de l'artère pulmonaire

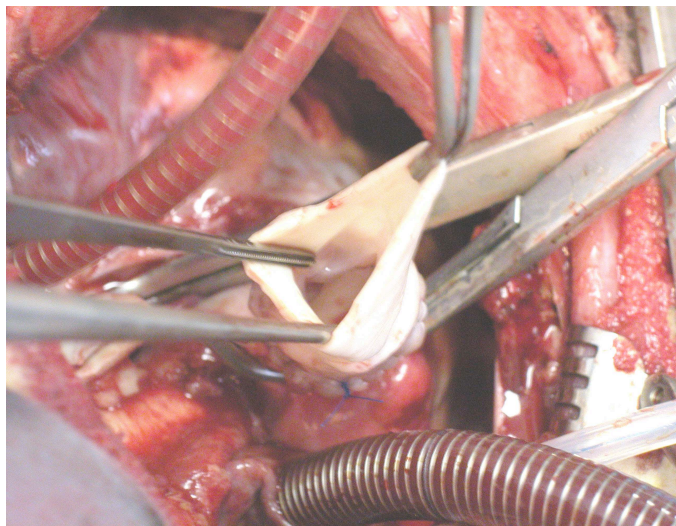


Photo opératoire : suture de la valve décellularisée

Figure 11 : modèle chirurgical d'implantation en position pulmonaire

2.2.1 Injection de G-CSF

Le G-CSF est un facteur de croissance hématopoïétique connu pour entraîner une augmentation du taux périphérique sanguin de leucocytes et notamment de polynucléaires. Il possède également un effet de mobilisation des cellules médullaires CD 34+. Shi a par ailleurs démontré l'existence, parmi les cellules CD 34+, de progéniteurs endothéliaux circulants, mobilisables par le G-CSF et capables d'endothélialiser des prothèses en Dacron® chez le chien [104]. Nous avons émis l'hypothèse que les cellules progénitrices mobilisées par le G-CSF pourraient migrer au niveau de la valve décellularisée (concept de *homing*) et participer à la recolonisation cellulaire de celle-ci.

Dans cette série d'expérimentations, 6 agneaux ont reçu une xénogreffe porcine décellularisée associée à un traitement quotidien par G-CSF (Neupogen®) durant 7 jours à la posologie de 10 µg/kg/j. L'implantation du substitut valvulaire avait lieu au 4^{ème} jour des injections.

Une numération et une formule sanguine étaient réalisées la veille de la première injection puis toutes les 48 H pendant 10 jours. Les sacrifices étaient réalisés à 3, 6, 8 et 16 semaines.

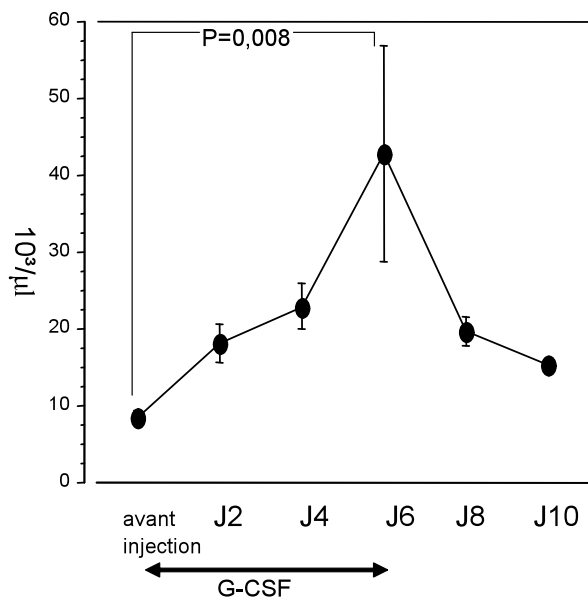
2.2.1.1 Effet du G-CSF sur les lignées cellulaires sanguines de l'agneau

L'évolution sous G-CSF du taux d'hémoglobine et du nombre de leucocytes, de polynucléaires neutrophiles et de monocytes est représentée sur la figure 12.

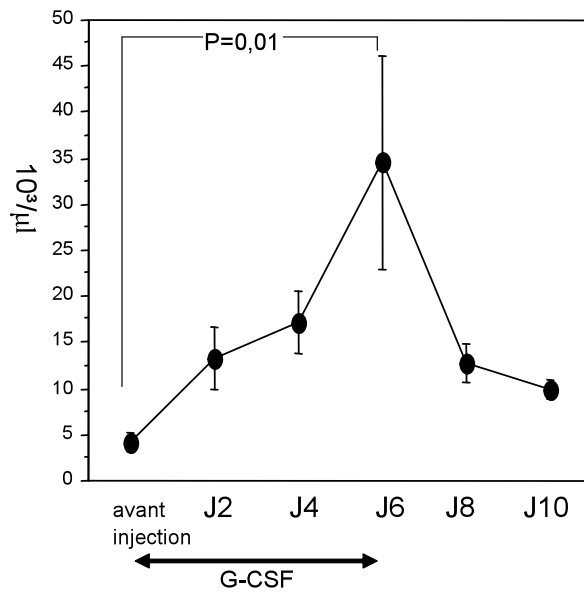
Le G-CSF modifiait la numération sanguine dès la première injection (J0) et son effet se majorait jusqu'à la dernière (J6). L'augmentation du nombre d'éléments figurés du sang était significative entre J0 et J6 pour les leucocytes ($p=0,008$), les polynucléaires neutrophiles ($p=0,01$) et les monocytes ($p=0,02$) et était suivie par un retour progressif vers les valeurs initiales.

On constatait sur les frottis sanguins l'apparition de formes immatures de polynucléaires à partir de 5 jours d'injections. Ces cellules immatures avaient disparu 4 jours après la fin des injections.

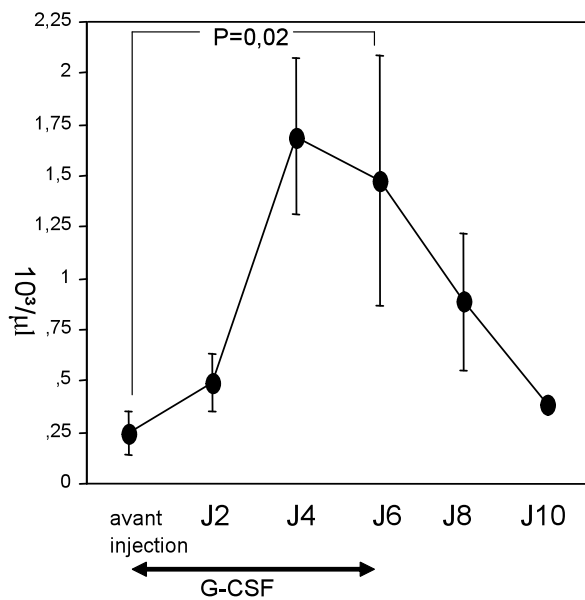
La chute du taux d'hémoglobine à J4 est due aux pertes sanguines per-opératoires.



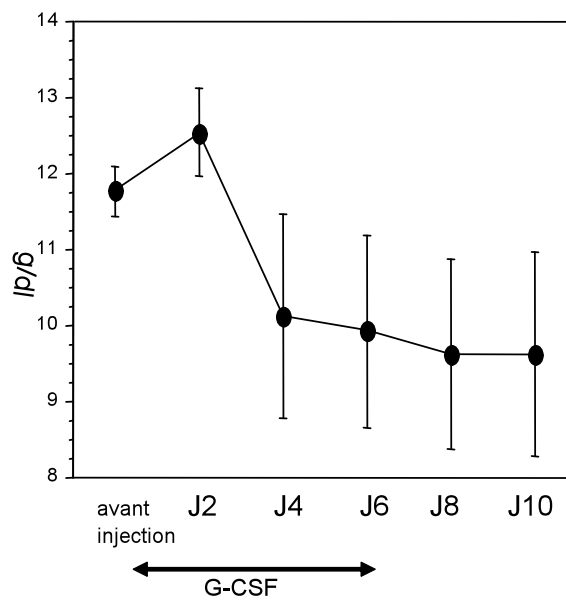
leucocytes



Polynucléaires neutrophiles



monocytes



hémoglobine

Figure 12 : Evolution de la formule sanguine sous G-CSF (Implantation valvulaire à J4)

2.2.1.2 Effets délétères du G-CSF sur les valves décellularisées

Nous avons observé une évolution défavorable et précoce avec l'apparition de calcifications macroscopiques notamment au niveau des sites d'anastomoses dès la 6^{ème} semaine, ainsi qu'un épaissement et une rétraction des sigmoïdes.

En histologie, la média artérielle présentait un aspect acellulaire et nécrotique avec fragmentation des fibres élastiques dès la 3^{ème} semaine. Il existait une réaction inflammatoire adventicielle majeure avec apparition de néovaisseaux ainsi qu'une hyperprolifération néointimale formée de cellules α -actine positives. L'endothélium était discontinu. Les sigmoïdes présentaient de nombreuses plages calcifiées et nécrotiques et étaient le siège d'une réaction inflammatoire intense.

Les principaux aspects macro et microscopiques de ces valves explantées sont représentés sur la figure 13.

Il est probable que ces effets délétères soient liés à la mobilisation par le G-CSF de sous-populations cellulaires matures (polynucléaires neutrophiles, lymphocytes T, monocytes-macrophages...) qui sont les acteurs classiques des réactions inflammatoires et immunitaires. Ces cellules pourraient donc avoir amplifié une éventuelle réaction immunitaire dirigée contre les antigènes matriciels résiduels de la valve décellularisée.

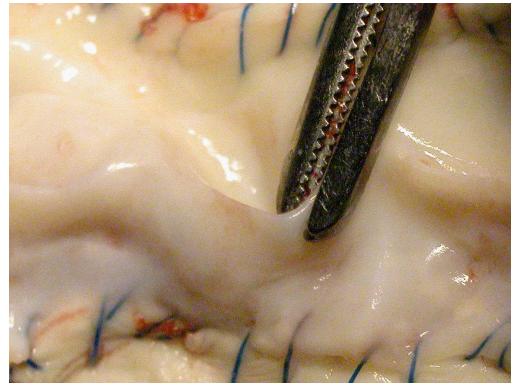
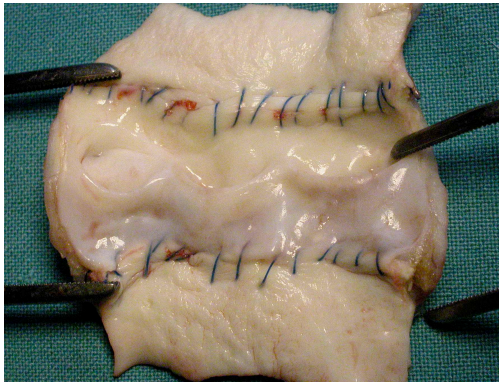
2.2.2 Effets de l'injection in situ de cellules médullaires mononucléées (CMM)

La seconde stratégie de recolonisation cellulaire que nous avons testée consistait en l'injection directe in situ en pré-opératoire immédiat dans la paroi artérielle de la valve décellularisée de cellules médullaires mononucléées autologues.

Un prélèvement médullaire autologue était effectué la veille de l'intervention par ponction de crête iliaque. Les cellules mononucléées étaient isolées sur milieu de séparation des lymphocytes MSL (EUROBIO) et stockés dans 2 ml de plasma autologue. Une culture contrôle des progéniteurs hématopoïétiques et un test de viabilité cellulaire au bleu trypan étaient réalisés le jour de l'intervention.

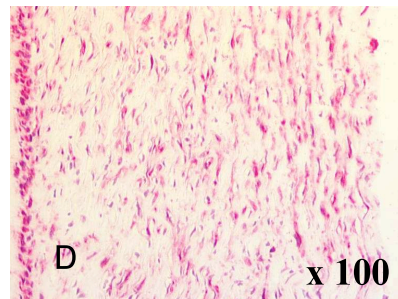
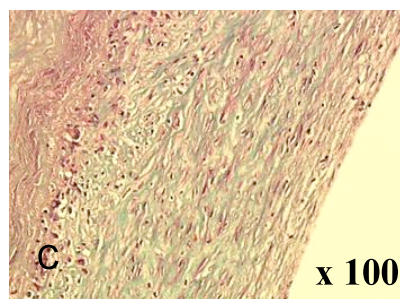
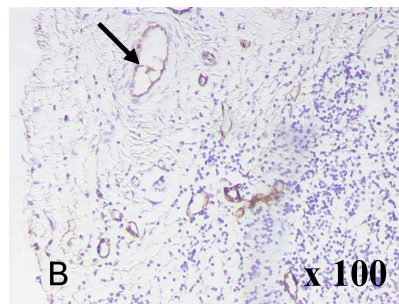
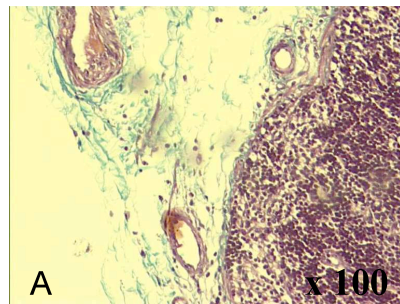
Cette série d'expérimentations a été réalisée chez 11 agneaux. La valve était implantée sous circulation extra-corporelle en position pulmonaire.

3 animaux ont été sacrifiés après 24 heures (n=2) et 7 jours (n=1) d'implantation pour une évaluation précoce du devenir des cellules injectées. Pour ce groupe d'animaux, les cellules



Aspect macroscopique

calcifications de la paroi aortique
 épaissement et rétraction des sigmoïdes



Aspect microscopique

A réaction inflammatoire adventicielle
 B Néovaisseaux
 C et D Hyperprolifération néointimale α -actine positive

Figure 13 : Aspects représentatifs des valves décellularisées explantées après 16 semaines
 Injection péri-opératoire de G-CSF

étaient marquées à l'aide d'un fluorochrome, le PKH 67 (4.10-6M, Sigma®). Après le sacrifice, les valves prélevées étaient coupées, une contre-coloration nucléaire au DAPI était réalisée, l'analyse se faisait en microscopie à fluorescence.

4 agneaux (groupe CMM) ont reçu une valve décellularisée avec injection de cellules médullaires mononucléées (CMM). Les sacrifices étaient réalisés après 16 semaines.

4 agneaux (groupe témoin) ont reçu une valve décellularisée sans injection de cellules. Les sacrifices étaient réalisés après 16 semaines.

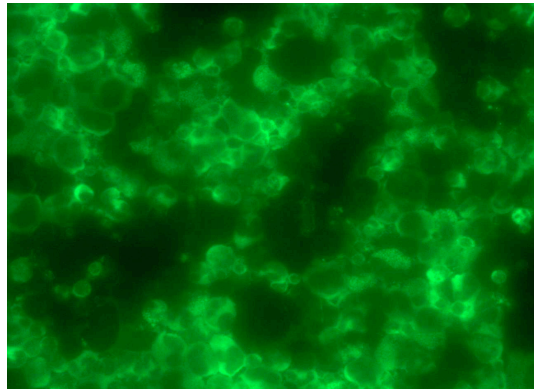
2.2.2.1 Devenir des cellules injectées (marquage fluorescent)

Les cellules injectées étaient retrouvées au sein de la paroi artérielle à J1 et à J7. Leur répartition était inhomogène, les cellules étant essentiellement mises en évidence sur le trajet d'injection (figure 14)

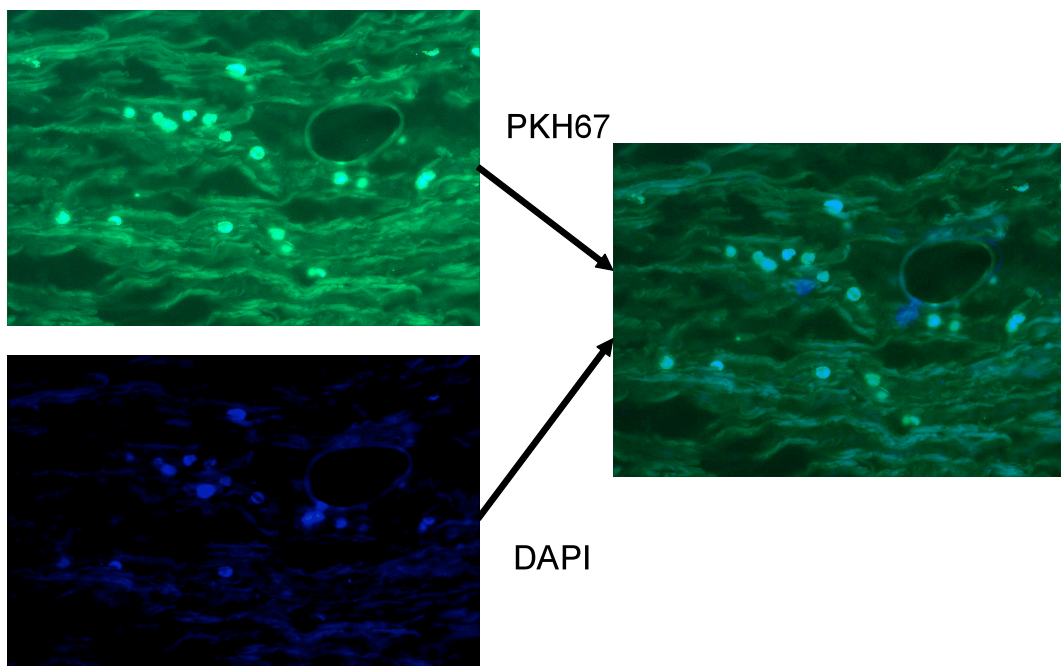
2.2.2.2 Effets de l'injection de cellules mononucléées médullaires autologues

Dans le groupe témoin (valve décellularisée sans injection cellulaire), les valves présentaient macroscopiquement des signes de dégénérescence modérée (épaississement et rétraction des sigmoïdes) avec de minimes calcifications. En histologie, il existait une réaction inflammatoire adventicielle et une prolifération myointimale importantes. La média était peu cellulaire. L'endothélialisation était incomplète.

Dans le groupe CMM (injection de cellules médullaires mononucléées), les résultats étaient hétérogènes macroscopiquement et histologiquement. 3 valves ne présentaient pas à l'explantation de signes de dégénérescence (absence de zones calcifiées, sigmoïdes souples sans rétraction), la dernière valve présentait en revanche une évolution défavorable avec présence de calcifications macroscopiques et rétraction importante des sigmoïdes. Ces données étaient confirmées en histologie ; dans les trois premiers cas, on ne constatait pas de réaction inflammatoire adventicielle, la prolifération myointimale était limitée et l'endothélialisation était complète. Dans le dernier cas, il existait par contre des calcifications, une fragmentation des fibres élastiques, des aspects histologique d'inflammation et de fibrose importants.



Avant injection (marquage in vitro)



7 jours après implantation
Présence de cellules PKH positives dans la paroi artérielle

Figure 14 : Mise en évidence des cellules injectées au sein de la valve 7 jours après implantation (marquage PKH 67)

Ces résultats suggéraient que l'injection in situ de cellules autologues médullaires pouvait réduire la détérioration de valves xénogéniques décellularisées, mais également dans des circonstances inconnues favoriser des réactions inflammatoires locales. Les cellules injectées étaient des cellules médullaires mononucléées non triées. Il existe au sein de cette population de CMM des progéniteurs hématopoïétiques capables de s'engager dans une voie de différenciation leucocytaire et d'initier des phénomènes inflammatoires et thrombotiques. Les CMM contiennent également des cellules souches mésenchymateuses (CSM) qui sont des cellules multipotentes capables de s'orienter en fonction des signaux de différenciation vers différentes voies tissulaires (os et cartilage, adipocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses, endothélium vasculaire) or les cellules présentes à l'état normal dans les valves cardiaques sont des fibroblastes, des myofibroblastes et des cellules endothéliales. Nous avons supposé que l'injection in situ de cette sous-population de CSM pouvait promouvoir *in vivo* la recolonisation cellulaire sans le risque d'augmenter les réactions inflammatoires locales.

2.2.3 Effets de l'injection in situ de cellules souches mésenchymateuses

Cette série d'expérimentations a été réalisée chez 10 agneaux. La valve était implantée sous circulation extra-corporelle en position pulmonaire.

5 animaux ont reçu une valve décellularisée avec injection de cellules mononucléées médullaires (groupe CMM)

5 animaux ont reçu une valve décellularisée avec injection de cellules souches mésenchymateuses (groupe CSM). Dans ce groupe, le prélèvement médullaire était réalisé 7 jours avant la chirurgie. Les cellules mononucléées étaient isolées selon la procédure précédemment décrite puis mises en culture en milieu MesenCult TM à 37°C pendant 7 jours. Les cellules mésenchymateuses étaient récupérées par trypsinisation et remises en suspension dans 2 ml de PBS. L'injection cellulaire se faisait comme pour le groupe CMM en pré-opératoire immédiat. Des cytocentrifugations étaient systématiquement réalisées à partir de la suspension cellulaire et un immuno-marquage anti vimentine (spécifique du cytosquelette de la lignée mésenchymateuse) était réalisé avant de s'assurer du caractère mésenchymateux des cellules isolées.

Les animaux étaient sacrifiés après 16 semaines. Une échocardiographie était réalisée 1 semaine après implantation et au moment du sacrifice. Une analyse macroscopique,

histologique et immuno-histologique des valves explantées était réalisée. Un fragment valvulaire était également prélevé pour digestion cellulaire enzymatique (collagénase, élastase) et cytocentrifugation sur lame des cellules effluentes.

2.2.3.1 Effets de l'injection in situ de cellules souches mésenchymateuses : résultats

Résultats échographiques (figure 15)

Il existait dans le groupe CMM une augmentation significative des gradients moyens transvalvulaire et distaux entre l'échographie post-opératoire et l'échographie tardive alors que ce gradient restait stable dans le groupe CSM. Après 16 semaines, le gradient moyen transvalvulaire (mm Hg) était significativement plus bas dans le groupe avec CSM (1.3 ± 0.39 dans le groupe CSM vs 4.24 ± 0.91 dans le groupe CMM, $p=0.016$), de même que le gradient moyen distal (4.05 ± 1.89 dans le groupe CSM vs 12.02 ± 6.95 dans le groupe CMM, $p=0.016$). L'index de perméabilité était significativement plus élevé dans le groupe CSM (0.76 ± 0.11 dans le groupe CSM vs 0.56 ± 0.1 dans le groupe CMM, $p=0.032$).

Résultats macroscopiques (figure 16)

L'aspect des valves explantées était variable dans le groupe CMM. Certaines valves présentaient peu de signes de dégénérescence, d'autres présentaient une paroi artérielle et des sigmoïdes épaissies ainsi que des zones calcifiées ou la présence d'un pannus fibreux en regard des anastomoses.

Les valves du groupe CSM ne présentaient pas de calcifications macroscopiques, les sigmoïdes étaient souples, la paroi artérielle restait fine sans pannus fibreux.

Résultats histologiques (figure 16)

Les aspects histologiques étaient également hétérogènes dans le groupe CMM. Il existait sur certaines valves une réaction inflammatoire adventicielle importante avec infiltration macrophagique. Les fibres élastiques étaient désorganisées, la coloration de Von Kossa objectivait la présence de calcifications.

Dans le groupe CSM, on ne constatait pas d'inflammation adventicielle ni de prolifération néo-intimale importante, l'endothélialisation était complète. On observait une recellularisation

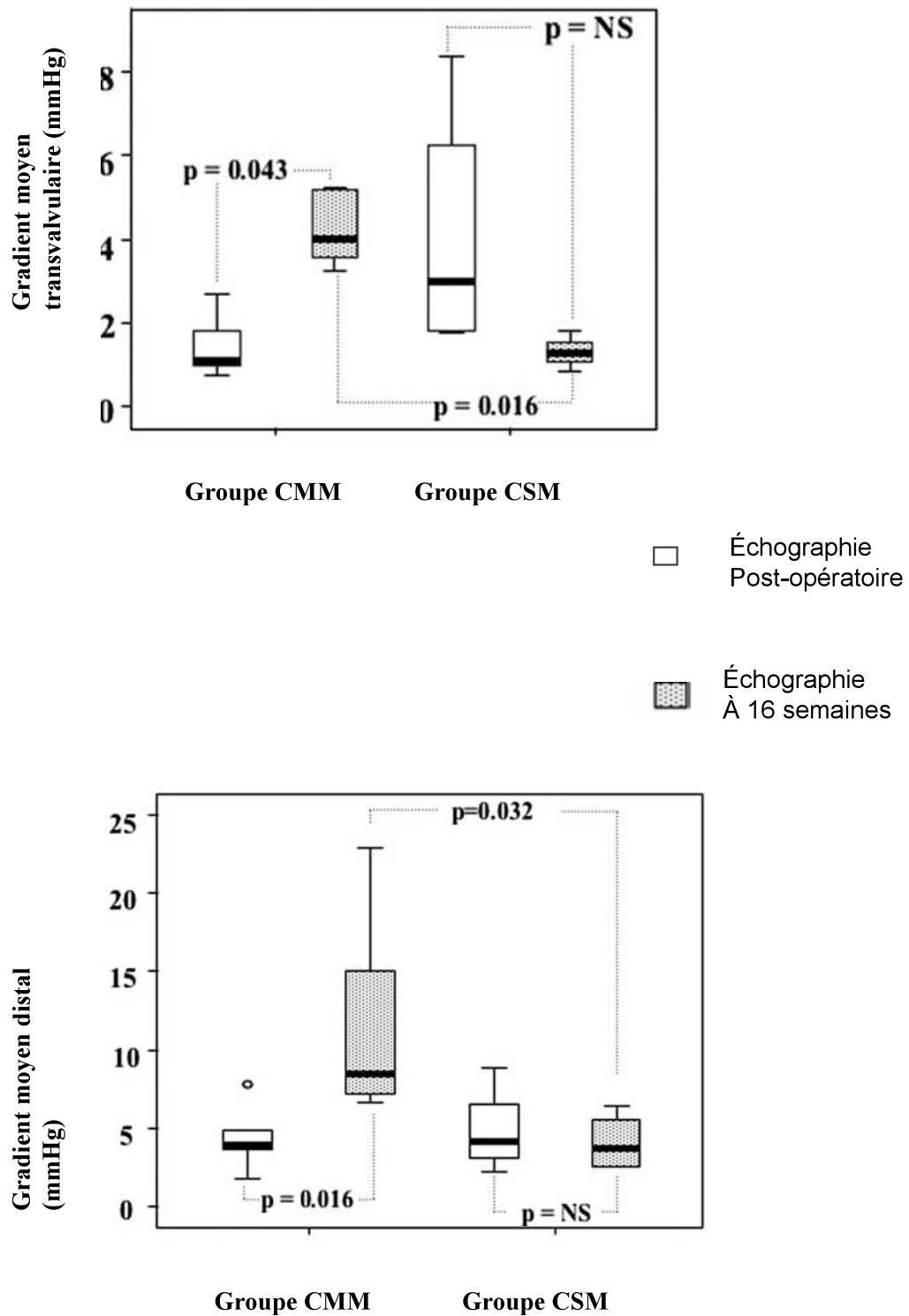


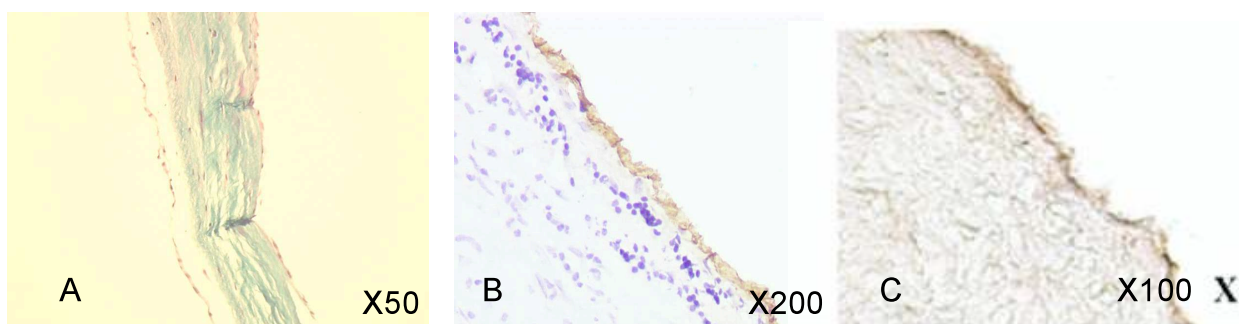
Figure 15 : Résultats échocardiographiques :
évolution des gradients moyens transvalvulaires et distaux



Aspect macroscopique

Absence de calcifications

Sigmoïdes souples



Aspect microscopique

A Sigmoïde, architecture conservée

B Anticorps anti-facteur Von Willebrandt, endothélium continu

C Anticorps anti- α -actine, recellularisation sous endothéliale

Figure 16 : Résultats macroscopiques et histologiques dans le groupe CSM (injection de cellules souches mésenchymateuses)

partielle de la région sous endothéliale (cellules musculaires lisses). La média artérielle était en revanche pauvrement cellulaire. L'architecture classique des sigmoïdes en 3 couches (ventricularis, spongiosa, fibrosa) était respectée.

2.2.3.2 Preuve du caractère autologue de la recellularisation (figure 17)

L'origine autologue de la recolonisation cellulaire a pu être déterminée à partir des cellules obtenues après digestion enzymatique et cyto-centrifugation des fragments de valves explantées. Nous avons mis au point une sonde d'ADN s'hybridant spécifiquement sur les centromères des chromosomes ovins. Cette sonde a été obtenue à partir de BAC (Bacterial Artificial Chromosome) pan-centromérique de mouton fournis par l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique). Cette sonde était marquée par un fluorochrome rouge après Nick-Translation.

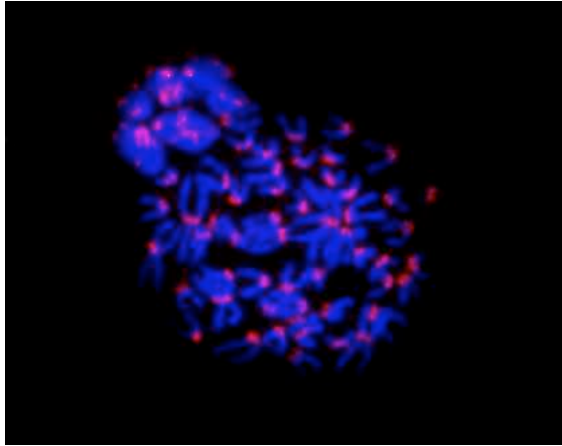
Les cellules effluentes obtenues à partir des fragments de valves explantées étaient dénaturées puis hybridées de façon spécifique avec cette sonde pendant 24 heures à 37°C. Une contre-coloration nucléaire au DAPI était effectuée. L'ensemble de ces cellules présentaient un marquage rouge positif prouvant leur origine autologue.

2.3 Propriétés biologiques des valves porcines décellularisées : étude préliminaire in vitro

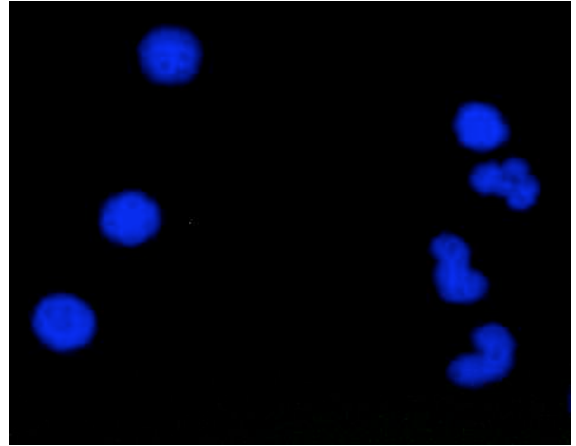
Après avoir cherché à améliorer les propriétés de ces valves décellularisées en faisant varier leur composant cellulaire, nous avons émis l'hypothèse que la biocompatibilité de la matrice décellularisée elle-même serait peut-être améliorable en terme d'immuno-tolérance et de thrombogénicité. L'étape préliminaire était de préciser in vitro l'effet de la décellularisation de valves porcines sur ces propriétés d'immunogénicité et de thrombogénicité.

2.3.1 Effet de la décellularisation sur l'immunogénicité de valves porcines

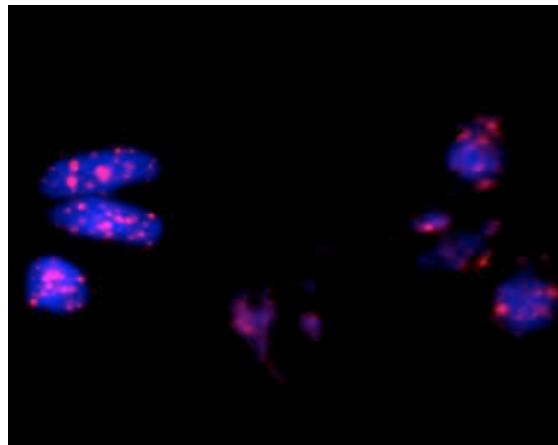
Nous avons utilisé un test dérivé du test de transformation lymphoblastique en utilisant les sigmoïdes valvulaires comme source d'antigène. Le but de cette série de manipulations était de comparer l'immunogénicité des valves décellularisées à celle des valves n'ayant subi aucun processus de décellularisation



Cellules ovines (contrôle positif)
Hybridation centromérique



Cellules bovines (contrôle négatif)
Absence d'hybridation



Cellules effluentes (valves explantées)
Hybridation positive (origine autologue)

Figure 17 : Preuve de l'origine autologue de la recolonisation cellulaire

Une étape préalable a été de déterminer la concentration optimale de cellules mononucléées humaines nécessaire à cette évaluation d'immunogénicité.

2.3.1.1 Concentration optimale des cellules mononucléées humaines

Dix-huit ml de sang humain ont été dilués dans du Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI 1640) puis déposés sur milieu de séparation des lymphocytes (MSL®). Une nouvelle centrifugation permettait d'isoler sur gradient de densité les cellules mononucléées totales.

Pour cette étude nous avons testé les concentrations suivantes : 20000, 30000, 40000, 50000, 60000, 70000, 800000 et 100000 cellules/ml. Pour chaque concentration cellulaire les manipulations étaient réalisées en triple : 500 µl de suspension cellulaire étaient déposés dans 3 puits d'une plaque 48 puits (VW international SAS – France) et cultivés pendant 7 jours à 37°C sous 5 % de CO₂.

Au bout de 7 et 10 jours une analyse macroscopique et un comptage cellulaire en cellule de Malassez nous ont permis de conclure que la concentration optimale de cellules était de 70000 cellules/ml soit 35000 cellules/puits. En effet les concentrations plus basses montraient une mort cellulaire importante et les concentrations plus élevées montraient une hyperprolifération cellulaire (amas cellulaires), ce qui rendait notre comptage inexact.

2.3.1.2 Evaluation de l'immunogénicité des valves décellularisées, méthode

Chaque sigmoïde porcine étudiée était déposée au fond d'un puits d'une plaque 48 puits de manière à ce qu'elle le tapisse et maintenue à l'aide d'un anneau en viton (Radiospares composants – France) pour éviter qu'elle ne flotte.

Les cellules mononucléées humaines étaient ensuite ajoutées à la quantité optimale de 35000 cellules/puits (concentration 70000 cellules/ml). L'expérience était réalisée en triple. Pour cela, les 3 sigmoïdes constituant la valve étaient utilisées. Le collagène bovin inerte de type I à concentration 0,1 N (Sigma-Aldrich - UK) servait de témoin négatif. Les plaques étaient incubées pendant 7 jours à 37°C sous 5% de CO₂. Au bout de 7 jours un comptage cellulaire

était effectué dans chaque puits en cellule de Malassez. Le résultat était exprimé en nombre de cellules par puits.

Nous avons comparé 9 sigmoïdes natives (non décellularisées) et 9 sigmoïdes décellularisées.

2.3.1.3 Immunogénicité des valves décellularisées, résultats

Le niveau de prolifération des cellules mononucléées humainesensemencées sur les sigmoïdes porcines au bout de 7 jours de culture reflète l'immunogénicité de celles-ci. Cette prolifération était significativement plus importante ($p=0,01$) avec les sigmoïdes n'ayant pas subi de processus de décellularisation par rapport aux sigmoïdes décellularisées (figure 18)

2.3.2 Effet de la décellularisation sur la thrombogénicité de valves porcines

2.3.2.1 Etude de thrombogénicité, matériel et méthodes

Interaction plasma riche en plaquettes et valve

La thrombogénicité des sigmoïdes valvulaires était évaluée à l'aide d'un test d'interaction entre les sigmoïdes et le plasma humain riche en plaquettes.

Le sang de sujets sains était prélevé sur tube citraté, centrifugé à 1100 trs/mn pendant 10 minutes, pour obtenir du plasma riche en plaquettes (PRP).

Les valves porcines décellularisées ($n=4$) et les valves non décellularisées ($n=4$) étaient divisées en 3 parties correspondant aux 3 sigmoïdes.

Chaque PRP, ajusté à 250 G/l, était mis en contact avec 1 sigmoïde décellularisée et 1 sigmoïde non décellularisée dans un tube en plastique. Un témoin plastique (sans valve) était également réalisé. L'ensemble des tubes était maintenu sous agitation et à température ambiante, et 50 μ l de PRP étaient prélevés à 1mn, 20 mn et 60 mn. La numération plaquettaire était réalisée sur automate Sysmex XS-800i.



Modèle : sigmoïde porcine étudiée maintenue par un anneau en viton

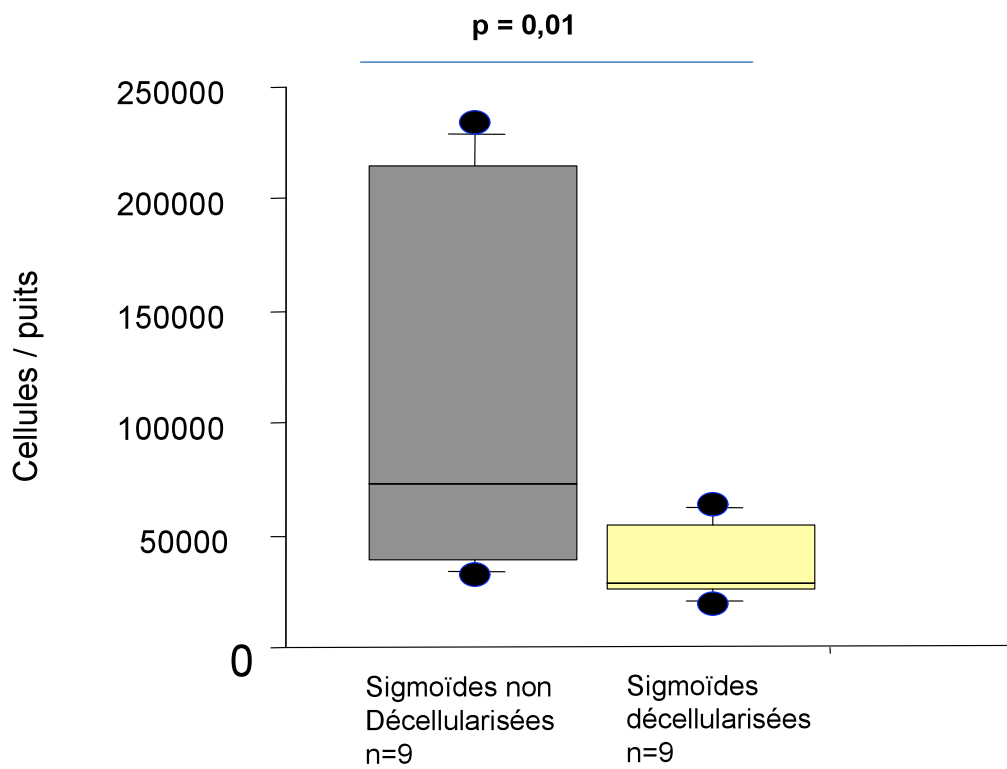


Figure 18 : Effet de la décellularisation sur l'immunogénicité des valves porcines

Micr`sc`pie électr`nique

Après la réalisation du test d'interaction avec le PRP, les sigmoïdes étaient préparées pour la microscopie électronique. Après 2 heures d'incubation avec le PRP, un fragment de 1 mm² était placé dans un tampon fixateur glutaraldéhyde, puis préparé pour montage et analyse en microscopie électronique.

2.3.2.2 Etude de thrombogénicité, résultats (figure 19)

Numérati`n plaquettaire

On observait une diminution précoce et importante du taux de plaquettes dans le PRP avec le groupe sigmoïdes décellularisées. Dans le groupe sigmoïdes non décellularisées, cette chute du taux de plaquette était faible, comparable à celle du groupe témoin (tube plastique seul). Ces résultats témoignaient d'une forte adhésion plaquettaire en présence de valves décellularisées.

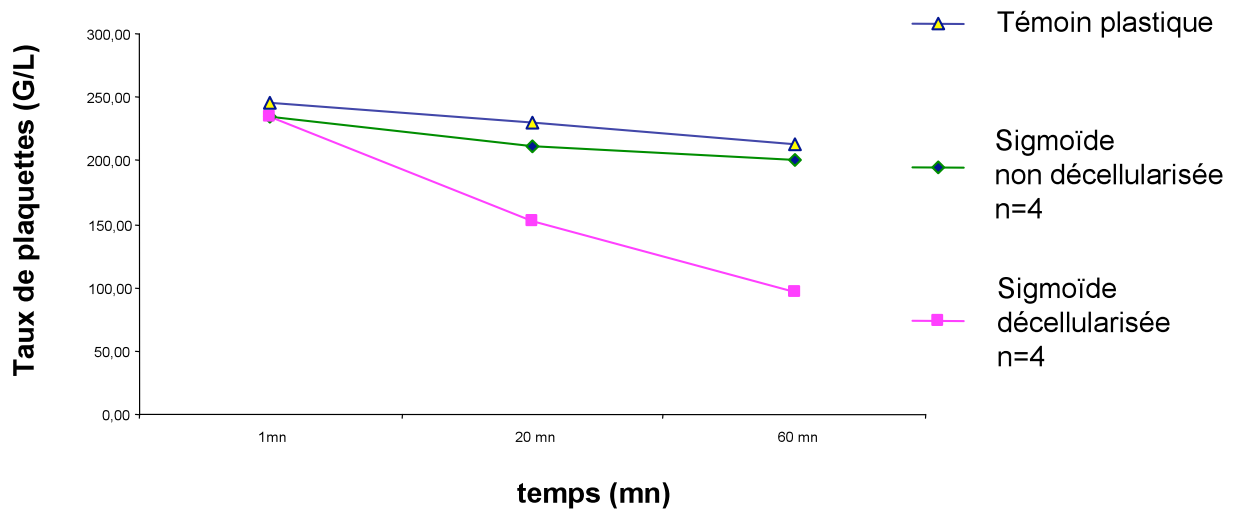
Micr`sc`pie électr`nique

Des amas de plaquettes activées étaient visibles à la surface des valves décellularisées. On notait également quelques plaquettes activées isolées.

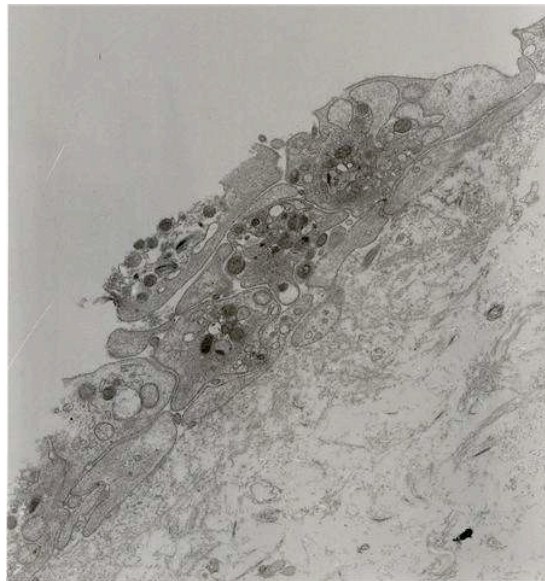
A la surface des valves non décellularisées, on ne notait aucun amas plaquettaires.

Ces observations confirmaient que le processus de décellularisation favorise l'adhésion plaquettaire et augmente la thrombogénicité des valves.

La dernière série d'expérimentations que nous avons réalisées concernait la mise au point d'un modèle d'implantation de ces valves décellularisées par voie transapicale sans circulation extra-corporelle en position pulmonaire



Evolution du taux de plaquettes dans le PRP en fonction du temps de contact avec les sigmoïdes



Microscopie électronique : amas de plaquettes activées à la surface des sigmoïdes décellularisées

Figure 19 : Effet de la décellularisation sur la thrombogénicité des valves porcines

2.4 Essai d'implantation transapicale

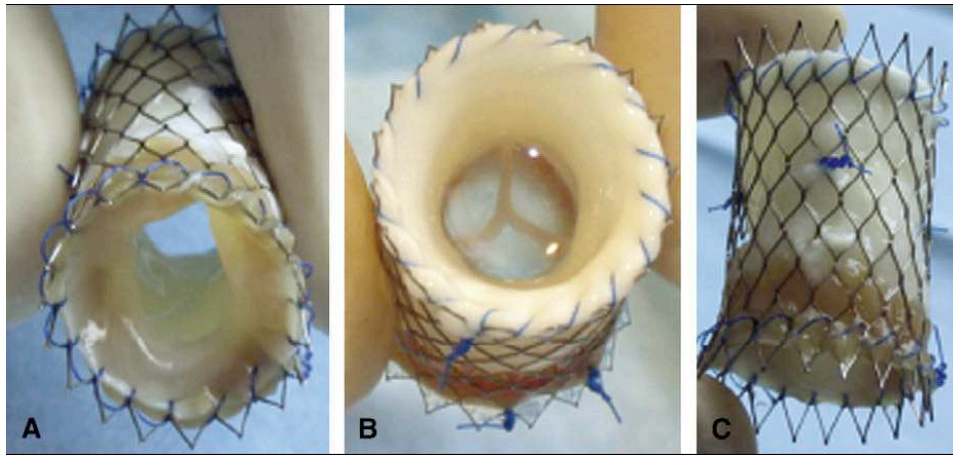
2.4.1 Modèle d'implantation transapicale (figure 20)

Stent et système de largage

Les valves étaient prélevées et décellularisées selon le même protocole. La collerette musculaire proximale était désépaissie puis la valve était suturée à l'intérieur d'un stent. Nous avons utilisé un stent autoexpansible en nitinol de 18 mm de diamètre et 30 mm de long (Bard Luminexx ; Angiomed GmbH, Karlsruhe, Germany). Les sutures proximale et distale étaient réalisées à l'aide de surjets de Prolène® 4/0. Des points supplémentaires étaient ajoutés au niveau de la paroi artérielle afin d'éviter une éventuelle déformation en hamac. Le système de largage était constitué d'un désilet de 24 French (Gore Introducer Sheath, Gore and associates, Flagstaff, Ariz) de diamètre constant. L'introducteur était modifié distalement afin de recevoir le stent valvé, son extrémité était conique. Le stent valvé était serti manuellement sur l'introducteur en pré-opérateur immédiat.

Technique opératoire

Une thoracotomie latérale gauche était réalisée dans le 4^{ème} espace intercostal, le tronc de l'artère pulmonaire était disséqué. Un cerclage était mis en place sur celui-ci afin de réduire son diamètre à 18 mm pour éviter une éventuelle migration distale du stent. Des marqueurs radio-opaques étaient mis en place en regard de l'anneau pulmonaire et du cerclage. Le point de ponction était défini sur l'infundibulum pulmonaire environ 2 cm en amont de l'anneau pulmonaire. 2 bourses de Prolène® 3/0 appuyées sur attelles de feutre étaient réalisées autour de ce point de ponction. La ponction était réalisée avec une aiguille 16 gauge, un guide 0,035 pouces était introduit à travers cette aiguille qui était alors remplacée par un désilet 6 french (Radiofocus Introducer II, Terumo Corporation, Tokyo, Japon). Le guide initial était remplacé par un guide courbe Rosen 0,035 pouces (Cook, William Cook Europe, Bjaeverskov, Danemark) poussé dans l'artère pulmonaire gauche distale, le désilet 6 French était retiré et remplacé sous amplificateur de brillance par le désilet contenant le stent valvé. Le stent était alors largué, le désilet retiré et les bourses serrées. Une échocardiographie épicaudique était réalisée avant la fermeture pour s'assurer de la bonne fonction valvulaire.



Aspect macroscopique du stent valvé

- A : persistance d'une fine collerette myocardique à l'extrémité proximale
- B : Compétence valvulaire et respect de l'anatomie native
- C : sutures complémentaires entre la paroi artérielle et le stent

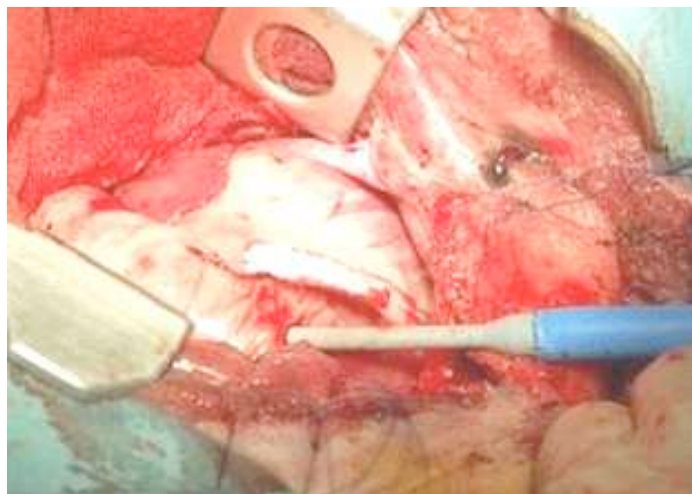


Photo opératoire : mise en place de l'ensemble introducteur/désilet porteur du stent valvé par ponction de l'infundibulum pulmonaire

Figure 20 : Modèle d'implantation transapicale

Protocole de suivi

15 agneaux ont été implantés. Une échocardiographie était réalisée après 7 jours, 1 mois et 4 mois avec mesure du gradient transvalvulaire et évaluation de la compétence valvulaire. Un cathétérisme cardiaque droit était réalisé le jour du sacrifice avec mesures hémodynamiques et angiographie pulmonaire.

2 animaux sont décédés précocement, 4 ont été sacrifiés après 7 jours d'implantation, 4 après 1 mois et 5 après 4 mois.

2.4.2 Résultats (figure 21)

Faisabilité

Le déploiement du stent valvé a été possible dans les 15 cas. La durée moyenne de la procédure était de 100 minutes, la durée de la phase de largage du stent valvé (de la ponction infundibulaire au retrait du désilet) était inférieure à 10 minutes.

Deux animaux sont morts précocement, l'un au premier jour post-opératoire en raison d'un pneumothorax compressif, l'autre après 3 semaines d'implantation en raison d'une endocardite entraînant une obstruction quasi-complète du stent valvé.

Résultats échocardiographiques

Le gradient maximal transvalvulaire restait inférieur à 12 mm Hg au cours du suivi. Une insuffisance pulmonaire minime était notée chez 1 animal après 1 semaine, chez 2 animaux après 1 mois et chez 1 animal après 4 mois. Une fuite périprothétique de grade 1 était en outre notée chez 4 animaux après 4 mois d'implantation.

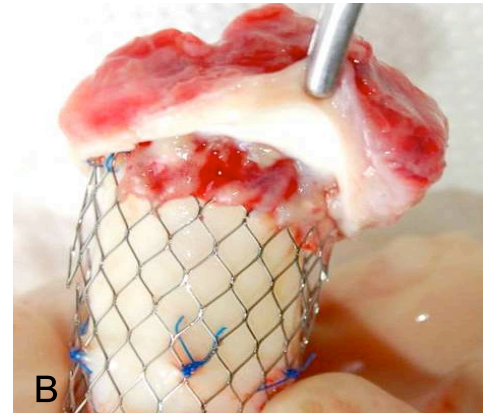
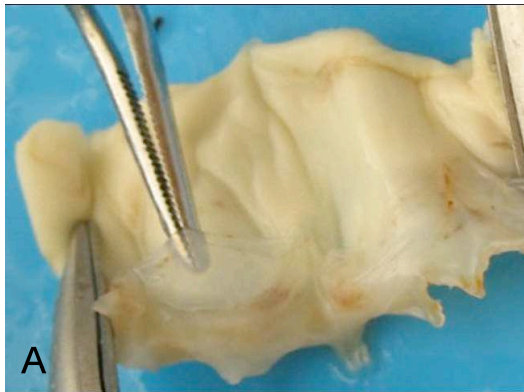
Résultats angiographiques

Le gradient transvalvulaire pulmonaire systolique mesuré par cathétérisme était de $18,5 \pm 12,4$ mm Hg (extrêmes 2,0-29 mm Hg) au 7^{ème} jour, de $13,5 \pm 10,6$ mm Hg (extrêmes 4,0-25 mm Hg) au 1^{er} mois et de $4,3 \pm 4,9$ mm Hg (extrêmes 1,0-10 mm Hg) au 4^{ème} mois.

Résultats macroscopiques et histologiques

La morphologie valvulaire macroscopique était sensiblement normale avec une compétence valvulaire respectée à 7 jours et 1 mois. A 4 mois d'implantation, ces résultats satisfaisants étaient observés chez 3 animaux, il existait en revanche chez 2 animaux une rétraction modérée des sigmoïdes expliquant la fuite minime observée en échographie. On constatait l'apparition, entre la paroi native de l'artère pulmonaire et le stent, d'un tissu de soutien dont l'importance se majorait avec le délai d'implantation : il n'existait pas après 7 jours, apparaissait sur la zone proximale après 1 mois et intéressait les zones proximales et distales après 4 mois.

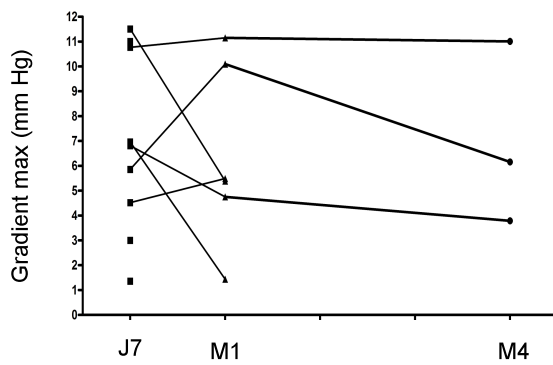
En histologie, on constatait essentiellement un très faible niveau de cellularité au sein de la paroi artérielle. Il existait également après 4 mois des dépôts de fibrine à la surface des sigmoïdes qui étaient macroscopiquement rétractées.



Exemple d'aspect macroscopique après 4 mois

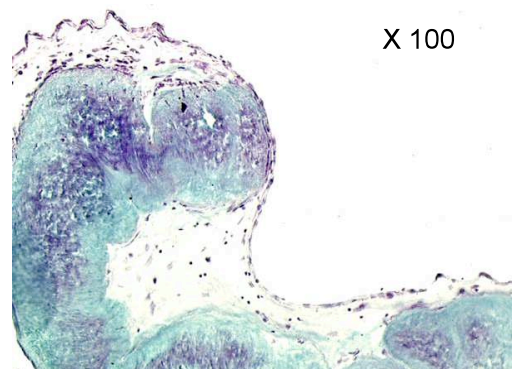
A : Absence de rétraction des sigmoïdes

B : apparition d'un tissu de connexion entre l'artère pulmonaire native et le stent valvé



Echographie

évolution du gradient transvalvulaire maximum



Histologie (trichrome de Masson)

Dépôts de fibrine sur une sigmoïde rétractée

Figure 21 : Implantation transapicale : résultats

III ARTICLES

3 Articles

3.1 Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization : Deleterious effects of granulocytes colony-stimulating factor

Juthier F, Vincentelli A, Gaudric J, Corseaux D, Fouquet O, Calet C, Le Tourneau T, Soenen V, Zawadski C, Fabre O, Susen S, Prat A and Jude B

J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 131: 843-852

Reply to the editor: Vincentelli A, Juthier F and Jude B

J Thorac Cardiovasc Surg 2006; 132: 737

Problématique

La recolonisation de valves décellularisées à l'aide de cellules autologues représente un défi dans le domaine de l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques dont l'objectif final est de créer un substitut valvulaire « idéal » doté de propriétés hémodynamiques physiologiques et d'un potentiel de croissance, réparation et remodelage. Cette recolonisation pourrait être obtenue in vivo à partir de cellules souches autologues d'origine médullaire. Le but de cette étude était d'étudier le potentiel de recolonisation spontanée in vivo de valves xénogéniques décellularisées dans un modèle ovin et d'évaluer les effets sur ce processus de la mobilisation de cellules progénitrices médullaires par un facteur de croissance, le G-CSF (granulocytes colony-stimulating factor).

Matériel et méthodes

12 agneaux ont reçu au niveau de l'aorte thoracique descendante une valve aortique porcine décellularisée. 6 animaux (groupe G-CSF) ont reçu un traitement additionnel par injections de G-CSF (10µg/kg/j) pendant 7 jours. 6 animaux n'ont reçu aucun traitement complémentaire (groupe contrôle). 5 animaux supplémentaires ont reçu une valve aortique non décellularisée (groupe xénogreffe). Les sacrifices étaient réalisés à 3, 6, 8 et 16 semaines après évaluation angiographique.

Résultats

Dans le groupe contrôle, il existait peu de modifications macroscopiques de l'aspect des sigmoïdes et de la paroi aortique alors qu'on observait dans les groupes G-CSF et xéno greffe un épaissement et une rétraction importants des sigmoïdes. Il existait dans les 3 groupes une infiltration cellulaire d'origine autologue au niveau des sigmoïdes, ainsi que des régions intimale et adventicielle de la paroi artérielle. La média artérielle restait par contre acellulaire. Les phénomènes de prolifération néo-intimale (cellules α -actine positives), de calcifications, d'infiltration inflammatoire et de néo-vascularisation adventicielle étaient majeurs dans les groupes G-CSF et xéno greffes et minimales dans le groupe contrôle. Une réendothélialisation continue n'était constatée que dans le groupe contrôle.

Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré les propriétés de résistance mécanique des valves porcines décellularisées selon ce protocole. Ces valves étaient implantées en position aortique descendante et supportaient les conditions de pression systémique. Les effets de l'injection de G-CSF étaient délétères avec l'apparition de phénomènes inflammatoires proches de ceux du rejet de xéno greffe.

Plusieurs protocoles de décellularisation ont été proposés dont les effets sont variables en terme d'efficacité, de réduction de l'immunogénicité et de propriétés mécaniques[53, 105]. Des résultats cliniques catastrophiques ont été rapportés dans une série pédiatrique après utilisation des valves porcines Synergraft® (Cryolife Inc) décellularisées selon un procédé enzymatique [50, 99] alors les homogreffes décellularisées selon ce même protocole et implantées chez l'adulte démontraient des propriétés hémodynamiques satisfaisantes à moyen terme[100, 106].

Nous avons utilisé un protocole de décellularisation non enzymatique basé sur l'utilisation de solutions hypotoniques et d'un détergent anionique, le Sodium Dodécyl Sulfate. Ce protocole a été décrit en 2002 par Korossis et al., il entraînait in vitro une décellularisation complète sans altération des protéines matricielles ni des propriétés mécaniques valvulaires[51, 52, 107]. Il permettait également in vitro d'obtenir une recolonisation cellulaire effective à partir de cellules musculaires lisses[54].

Dans le groupe contrôle (valve décellularisée sans traitement adjuvant), nous avons observé une recolonisation cellulaire limitée sans réaction inflammatoire importante ni calcification confirmant in vivo le potentiel de recolonisation de ce support. Cette recellularisation restait cependant insuffisante notamment au niveau de la média qui restait acellulaire.

Nous avons tenté de promouvoir la recolonisation cellulaire en utilisant des injections de G-CSF afin de mobiliser les progéniteurs médullaires autologues. Les effets bénéfiques du G-CSF ont été démontrés dans des modèles d'infarctus du myocarde avec une réduction de la taille de l'infarctus et une diminution du remodelage défavorable post-infarctus[108-111]. Il a également été démontré que le G-CSF pouvait favoriser l'endothélialisation de prothèses vasculaires chez le chien et mobiliser des progéniteurs endothéliaux chez les patients coronariens[112, 113].

Dans notre modèle, les effets de l'injection de G-CSF étaient délétères avec l'apparition de phénomènes inflammatoires, d'une néovascularisation adventicielle et de calcifications. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces effets néfastes. Le premier effet du G-CSF est la mobilisation dans le sang périphérique de polynucléaires neutrophiles et de cellules matures comme les monocytes et les lymphocytes T qui sont les cellules effectrices de la réponse inflammatoire et immunologique. Ces cellules pourraient ainsi amplifier la réaction immunitaire dirigée contre les xénoantigènes matriciels résiduels. Des effets négatifs semblables du G-CSF ont été rapportés dans un essai clinique réalisé chez l'homme après infarctus du myocarde, les patients traités par G-CSF présentaient un taux de resténose intrastent significativement plus élevé.

En conclusion, dans cette étude, les valves porcines décellularisées présentaient des propriétés mécaniques satisfaisantes *in vivo* et permettaient une recolonisation cellulaire partielle. Le G-CSF avait des effets délétères proinflammatoires. Il était donc nécessaire d'envisager une autre méthode d'optimisation de la recolonisation cellulaire.

3.2 In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates ?

Vincentelli A, Wautot F, Juthier F, Fouquet O, Corseaux D, Maréchaux S, Le Tourneau T, Fabre O, Susen S, Van Belle E, Mouquet F, Decoene C, Prat A and Jude B

J Thorac Cardiovasc Surg 2007; 134:424-32

Reply to the editor: Vincentelli A, Juthier F and Jude B

J Thorac Cardiovasc Surg 2008; 135:1190

Reply to the editor: Vincentelli A, Juthier F and Jude B

J Thorac Cardiovasc Surg 2008; 135:1407

Problématique

Les cellules souches médullaires ont déjà été utilisées in vitro avec succès dans le domaine de l'ingénierie tissulaire de valves cardiaques[74]. Une sous-population de ces cellules médullaires, les cellules mésenchymateuses, sont capables de s'engager dans différentes voies de différenciation et de donner naissance entre autres aux cellules endothéliales et aux myofibroblastes qui sont les types cellulaires physiologiquement présents au sein des valves cardiaques[114]. Nous avons émis l'hypothèse que l'injection de cellules souches médullaires autologues au sein de valves porcines décellularisées, en pré-opératoire immédiat, pourrait favoriser la recolonisation de ces valves et limiter les phénomènes de dégénérescence. Nous avons ainsi étudié l'effet de l'injection in situ de cellules médullaires mononucléées autologues (CMM) et de cellules souches mésenchymateuses (CSM) sur le comportement de valves porcines décellularisées dans un modèle ovin.

Matériel et méthodes

14 agneaux ont été opérés sous circulation extra-corporelle et ont reçu en position pulmonaire une valve pulmonaire porcine décellularisée après injection dans celle-ci de cellules médullaires mononucléées (groupe CMM, n=7) ou cellules souches mésenchymateuses (groupe CSM, n=7). Les sacrifices étaient réalisés après 4 mois. Une évaluation échocardiographique, macroscopique et histologique était réalisée.

Résultats

Il existait dans le groupe CMM une augmentation significative des gradients moyens transvalvulaire et distaux entre l'échographie post-opératoire et l'échographie tardive alors que ce gradient restait stable dans le groupe CSM. Après 16 semaines, le gradient moyen transvalvulaire (mm Hg) était significativement plus bas dans le groupe CSM (1.3 ± 0.39 dans le groupe CSM vs 4.24 ± 0.91 dans le groupe CMM, $p=0.016$), de même que le gradient moyen distal (4.05 ± 1.89 dans le groupe CSM vs 12.02 ± 6.95 dans le groupe CMM, $p=0.016$). L'index de perméabilité était significativement plus élevé dans le groupe CSM (0.76 ± 0.11 dans le groupe CSM vs 0.56 ± 0.1 dans le groupe CMM, $p=0.032$).

L'analyse histologique objectivait une réendothélialisation et une recolonisation cellulaire effective dans les deux groupes, cependant on constatait dans le groupe CMM une réaction inflammatoire adventicielle ainsi qu'un épaissement et une rétraction des sigmoïdes valvulaires. L'aspect des valves du groupe CSM était proche de celui d'une valve native, avec une architecture extra-cellulaire respectée, une recolonisation cellulaire partielle dans la région sous-endothéliale et une endothélialisation complète.

Discussion

Dans cette étude, nous avons démontré que l'injection directe in situ en pré-opératoire de cellules médullaires au sein de valves porcines décellularisées permettait d'induire la recolonisation cellulaire et l'endothélialisation de celles-ci. L'originalité de ce modèle réside dans l'absence de phase préalable de culture in vitro. La plus part des équipes travaillant sur le sujet réalisent en effet un ensemencement cellulaire suivi d'une étape de culture en bio-réacteur afin de reproduire les conditions de flux et de pression physiologiques[69, 74].

Nous avons comparé les effets de deux population cellulaires médullaires : les CMM et les CSM. Les résultats échocardiographiques après 4 mois étaient en faveur du groupe CSM avec des gradients transvalvulaires et distaux significativement plus bas et un index de perméabilité supérieur. De plus, histologiquement, les valves du groupe CMM présentaient des phénomènes inflammatoires associés à un épaissement modéré des sigmoïdes, alors que la structure des valves du groupe CSM était conservée sans développement de pannus fibreux ni phénomènes de dégénérescence.

Le mécanisme par lequel s'exprime cet effet bénéfique des CSM n'est cependant pas complètement élucidé. La première hypothèse est celle d'une différenciation directe des CSM en fibroblastes capables de synthétiser activement du collagène et en cellules endothéliales. Les CSM sont en effet des cellules pluripotentes présentes au sein de différents tissus dont la moelle osseuse, elles sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes, cellules neuronales, cellules musculaires lisses et squelettiques et cellules endothéliales[114-116]. Leur potentiel de différenciation dépend entre autres de facteurs environnementaux mécaniques[117, 118]. Ces cellules sont de plus capables de produire des cytokines et des facteurs de croissance qui jouent un rôle dans leur prolifération[119].

La seconde hypothèse est celle d'un mécanisme paracrine, il a en effet été démontré que les CSM sont capables de sécréter des facteurs chimiotactiques induisant le recrutement et la différenciation de cellules autologues[120, 121]. D'autres auteurs ont mis en évidence dans des modèles d'infarctus du myocarde ou de cardiomyopathie dilatée une augmentation du taux de progéniteurs endothéliaux circulants ou une diminution d'activité des métalloprotéinases matricielles liées aux CSM[122, 123].

Enfin, il a été suggéré que les CSM possédaient des propriétés immuno-modulatrices et qu'elles n'induisaient qu'une faible réaction immunitaire de la part des cellules T allogéniques. Ce phénomène a été démontré dans le domaine des greffes hématopoïétiques et

dans l'étude des rejets « greffon versus hôte ». Ce mécanisme pourrait être en faveur dans notre étude d'une diminution de la réaction immunitaire dirigée contre les xénoantigènes matriciels résiduels au sein des valves décellularisées.

En conclusion, dans cette étude, nous avons démontré qu'il était possible d'obtenir à partir de valves décellularisées une recolonisation cellulaire spontanée in vivo sans avoir recours au préalable à une phase de culture cellulaire en bioréacteur. L'utilisation de cellules mésenchymateuses dans cette optique semble prometteuse dans la mesure où celles-ci amélioreraient le comportement hémodynamique et l'architecture histologique des valves implantées.

3.3 Experimental off-pump transventricular pulmonary valve replacement using a self-expandable valved stent: a new approach for pulmonary incompetence after repaired tetralogy of Fallot?

Godart F, Bouzguenda I, Juthier F, Wautot W, Prat A, Rey C, Corseaux D, Ung A, Jude B and Vincentelli A.

J Thorac Cardiovasc Surg 2009; 137:1141-5

Problématique

L'utilisation de stents valvés pour la correction des valvulopathies pulmonaires sans recours aux techniques de circulation extra-corporelle est une technologie émergente en cardiologie interventionnelle pédiatrique. Les principales limites de ces procédures sont représentées par le manque de substituts valvulaires disponibles sur le marché et, dans le cas des insuffisances pulmonaires après correction chirurgicale des tétralogies de Fallot, par la dilatation du tronc de l'artère pulmonaire. Le but de cette étude était de tester la possibilité d'utiliser une voie d'abord transventriculaire droite pour implanter une valve porcine décellularisée montée à l'intérieur d'un stent autoexpandable.

Matériel et méthodes

Nous avons implanté une valve porcine décellularisée suturée à l'intérieur d'un stent autoexpandable en nitinol chez 15 agneaux. L'implantation était réalisée après thoracotomie gauche et cerclage du tronc de l'artère pulmonaire par ponction de l'infundibulum ventriculaire droit. Les animaux étaient suivis par échocardiographie et sacrifiés après cathétérisme droit à 1 semaine, 1 mois et 4 mois.

Résultats

Le déploiement du stent valvé a été possible dans les 15 cas. Deux animaux sont morts précocement (1 pneumothorax et 1 endocardite). En échocardiographie, il n'existait pas de gradient transvalvulaire, une insuffisance pulmonaire minime était notée chez 4 animaux. Une fuite périprothétique de bas grade était notée chez 4 animaux après 4 mois d'implantation.

Le gradient transvalvulaire pulmonaire systolique mesuré par cathétérisme était de $18,5 \pm 12,4$ mm Hg (n= 4) au 7^{ème} jour, de $13,5 \pm 10,6$ mm Hg (n=4) au 1^{er} mois et de $4,3 \pm 4,9$ mm Hg (n= 5) au 4^{ème} mois. Histologiquement, on constatait l'apparition, entre la paroi native de l'artère pulmonaire et le stent, d'un tissu de soutien dont l'importance se majorait avec le délai d'implantation.

Discussion

Le remplacement valvulaire pulmonaire est fréquemment requis en chirurgie cardiaque congénitale, notamment après correction d'une tétralogie de Fallot lorsqu'un patch transannulaire est utilisé[124]. La régurgitation pulmonaire induite entraîne à terme une surcharge, une dilatation et une dysfonction ventriculaire droite génératrices de morbidité et mortalité tardives[125]. Il s'y associe souvent une dilatation du tronc de l'artère pulmonaire. Nous avons démontré dans cette étude la possibilité d'utiliser une approche hybride pour implanter une valve porcine décellularisée montée à l'intérieur d'un stent autoexpansible par voie d'abord transventriculaire droite.

Le recours à l'implantation d'un stent valvé par voie percutanée dans cette indication a initialement été décrit par Bonhoeffer avec la valve Melody® (Medtronic Inc, Minneapolis, Minn)[126-128]. Cette technique est cependant actuellement réservée aux implantations à l'intérieur d'un tube valvé prothétique calcifié de moins de 22 mm[129] et ne permet pas le traitement des régurgitations pulmonaires observées après correction chirurgicale d'une tétralogie de Fallot lorsqu'un patch trans-annulaire a été utilisé.

La voie d'abord transventriculaire a été développée dans cette indication et présente l'avantage de réduire la distance entre le point de ponction et le site de largage, elle permet d'éviter le recours à une circulation extra-corporelle et élimine les complications liées à la ponction d'un vaisseau périphérique[130]. D'autres équipes ont déjà utilisé chez l'homme cette approche hybride avec de bons résultats initiaux[131, 132]. Des cas de migration de stent ou de fuites paravalvulaires importantes ont cependant été rapportés dans les suites imposant une nouvelle intervention, c'est pourquoi nous avons réalisé un cerclage systématique du tronc de l'artère pulmonaire. De même l'ajout de points transfixiants entre le stent et la paroi artérielle de la valve a permis d'éviter une éventuelle déformation en hamac. Ce cerclage serait probablement plus délicat dans un contexte de sternotomie réductrice ce qui constitue une limite importante de l'étude. A l'inverse, cette approche hybride permettrait théoriquement de réduire la taille de l'artère pulmonaire par plicature longitudinale de celle-ci.

Le substitut valvulaire de choix actuellement utilisé pour la reconstruction de la voie d'éjection ventriculaire droite est actuellement l'homogreffe pulmonaire dont la relative pénurie limite l'utilisation. L'intérêt des valves obtenues par ingénierie tissulaire pour le remplacement valvulaire pulmonaire réside dans leur disponibilité et dans la variabilité des tailles théoriquement disponibles. Stock et al ont ainsi implanté chez le mouton en position

pulmonaire des valves synthétiques ensemencées avec des cellules endothéliales autologues et rapporté des résultats hémodynamique et histologiques satisfaisant après 6 mois[66].

En conclusion dans cette étude, nous avons démontré la possibilité d'utiliser une approche hybride pour implanter une valve porcine décellularisée suturée à l'intérieur d'un stent autoexpansible. La technique opératoire était fiable et reproductible et la fonction valvulaire conservée après 4 mois d'implantation. Cette stratégie permettait de plus d'envisager un cerclage et une réduction de diamètre du tronc de l'artère pulmonaire, ce qui représente un intérêt majeur dans le traitement des insuffisances pulmonaires après correction chirurgicale d'une tétralogie de Fallot.

IV SYNTHÈSE ET PERSPECTIVES

4 Synthèse et perspective

Au cours de cette série d'expérimentations, nous avons donc

1/ démontré que les valves porcines décellularisées selon le protocole décrit par Booth et Korossis associant les effets de solutions hypotoniques et d'un détergent anionique, le sodium dodécyl sulfate, présentaient un comportement mécanique *in vivo* autorisant leur implantation dans des conditions de flux pulmonaire et systémique chez l'agneau. Nous n'avons observé aucun cas de dilatation anévrysmale, de rupture, de sténose ou d'insuffisance valvulaire jusqu'à 4 mois après l'implantation.

2/ évalué l'efficacité de différentes stratégies de recolonisation cellulaire de cette matrice à partir de cellules souches autologues.

La première de ces stratégies consistait à injecter un facteur de croissance : le G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) afin de mobiliser des progéniteurs médullaires dans le sang périphérique. Alors que le G-CSF recombinant humain induisait une augmentation significative du nombre de globules blancs périphériques chez l'agneau, l'effet sur la valve était délétère et induisait après 16 semaines d'implantation des réactions inflammatoires et de fibrose proches de celles du rejet de greffe. La seconde stratégie consistait à injecter *in situ* dans la valve décellularisée, immédiatement avant son implantation, des cellules mononucléées médullaires (CMM) d'origine autologue (prélevées chez l'agneau receveur en pré-opératoire immédiat) et triées par gradient de densité. Les résultats suggéraient que l'injection *in situ* de CMM autologues pouvait réduire la détérioration de ces valves xénogéniques décellularisées, mais également dans des circonstances inconnues favoriser des réactions inflammatoires locales.

Nous avons alors utilisé une sous-population de CMM, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) afin d'éviter ces phénomènes inflammatoires locaux. L'évaluation échocardiographique des valves préparées avec ces cellules était très satisfaisante après 4 mois d'implantation sans augmentation du gradient transvalvulaire moyen ni insuffisance valvulaire. L'aspect histologique de ces valves était proche de celui d'une valve native, avec une architecture extra-cellulaire respectée, une recolonisation cellulaire partielle dans la région sous-endothéliale et une endothélialisation complète. L'origine autologue de cette

recolonisation cellulaire était prouvée par FISH (fluorescent in situ hybridation) en utilisant une sonde pan-centromérique spécifique du mouton.

3/ caractérisé les effets de la décellularisation de valves porcines sur leur biocompatibilité en vue d'une implantation chez l'homme. Le procédé de décellularisation entraînait une diminution de leur immunogénicité (effet bénéfique) mais une augmentation de leur thrombogénicité (effet délétère).

4/ mis au point un modèle d'implantation transapicale de ces valves décellularisées suturées à l'intérieur d'un stent autoexpansile. Cette approche hybride était fiable et reproductible et la fonction valvulaire était conservée après 4 mois d'implantation.

L'utilisation de valves porcines décellularisées comme tissu de soutien nous a permis de profiter d'emblée de leurs bonnes performances hémodynamiques *in vivo*. Ce choix n'est cependant pas anodin dans la mesure où la matrice extracellulaire elle-même conserve une certaine immunogénicité. Rieder [53] a ainsi comparé la réduction d'immunogénicité induite par le procédé de décellularisation lorsque celui-ci était appliqué à des valves porcines ou humaines. La migration de monocytes humains au contact de ces deux types de valves (reflet de leur immunogénicité) était significativement réduite après décellularisation. Cependant seule la décellularisation de valves humaines permettait d'abolir complètement cette réponse monocyttaire. Il sera donc nécessaire à l'avenir de reproduire une partie de nos manipulations avec des allogreffes décellularisées. Si nous souhaitons pour d'évidentes raisons de disponibilité continuer à utiliser des valves porcines décellularisées, il sera également probablement nécessaire de valider un procédé permettant de réduire l'immunogénicité matricielle résiduelle. Nous pourrions dans cette optique tester les effets de la solution SCOT (Solution de Conservation des Organes et des Tissus). Cette solution est utilisée en pratique clinique comme liquide de préservation d'organes transplantés. Elle contient notamment un colloïde, le polyéthylène glycol (PEG) qui aurait pour effet de limiter l'œdème tissulaire pendant le transport ou la conservation d'organes du fait de la pression oncotique qu'il exerce et de diminuer l'immunogénicité du greffon par un phénomène passif de masquage des sites antigéniques du greffon. Cet effet est connu sous le terme d'« immunocamouflage ». Cette dernière propriété pourrait être utile dans notre modèle [133, 134].

L'originalité de nos travaux résidait dans la tentative d'obtenir une recolonisation cellulaire *in vivo* en évitant la phase d'ensemencement et de culture cellulaire *in vitro* préalable. L'injection directe *in situ* dans la valve décellularisée de cellules mésenchymateuses autologues en pré-opératoire immédiat s'est avérée efficace dans la mesure où elle améliorait les paramètres échocardiographiques et l'aspect histologiques des valves ainsi préparées. Dohmen a rapporté en 2006 les résultats d'une étude dans laquelle il comparait le devenir de valves décellularisées implantées chez l'agneau avec et sans phase préalable d'ensemencement cellulaire (cellules endothéliales). Les résultats à 6 mois étaient satisfaisants et comparables entre les deux groupes[135]. Dans notre étude, la recolonisation cellulaire restait cependant limitée au sein de la média artérielle. Nous avons également constaté comme d'autres que le processus de décellularisation augmentait la thrombogénicité du tissu valvulaire.

Plusieurs stratégies ont été très récemment décrites afin d'améliorer la biocompatibilité des valves décellularisées. L'équipe de Stamm a ainsi mis au point un tissu de soutien constitué de valves porcines décellularisées enduite d'un polymère composite constitué de 82% P3HB et de 18% P4HB. Les résultats semblaient très prometteurs : la thrombogénicité était diminuée, l'adhésion et la prolifération cellulaire étaient supérieures à celles constatées en présence de tissu décellularisé seul, les propriétés mécaniques *in vivo* et *in vitro* étaient également très satisfaisantes y compris en position systémique[49]. Une autre approche très originale a été décrite par Ye[136] Cette équipe est parvenue à fixer sur une valve porcine décellularisée un anticorps anti CD 90 de rat. Le CD 90 est une protéine impliquée dans les interactions cellules-cellules et cellules-matrice. Elle est entre autres exprimée à la surface des cellules souches mésenchymateuses. Lorsque ces valves étaient cultivées en bioréacteur pulsatile en présence de cellules souches mésenchymateuses de rat, on constatait une adhésion cellulaire bien plus importante, y compris lorsque les conditions de flux étaient élevées. Cette technique de fixation d'anticorps pourrait donc permettre de stimuler la recolonisation cellulaire de valves décellularisées et ouvre la porte à d'autres possibilités. On pourrait ainsi imaginer fixer d'autres anticorps par exemple anti-CD 34 ou anti-CD 133 humains (protéines exprimées à la surface des progéniteurs endothéliaux circulants) sur les valves et promouvoir ainsi l'endothélialisation valvulaire.

Nous souhaiterions également pouvoir préciser l'origine et le mode de recolonisation cellulaire des valves décellularisées que nous avons mises au point. Nous avons pu prouver

l'origine autologue de cette recolonisation par FISH (fluorescent in situ hybridation) en utilisant une sonde pan-centromérique spécifique du mouton. Le marquage fluorescent des cellules injectées permettait de repérer celles-ci au sein de la paroi artérielle de la valve implantée jusqu'à 7 jours après la chirurgie, il n'est par contre pas possible avec cette technique de marquage de suivre l'évolution cellulaire après ce délai. Il est en revanche possible de réaliser une culture de cellules médullaires en présence de microparticules métalliques : les cellules incorporent ces microbilles qui restent théoriquement détectables après prolifération et différenciation cellulaires. Nous devrions donc pouvoir marquer à l'aide de microparticules les cellules souches mésenchymateuses injectées ce qui permettrait de suivre leur évolution après implantation à plus long terme.

Bibliographie

1. Bahnson, H.T., *Surgery for acquired valvular heart disease*. Md State Med J, 1962. **11**: p. 313-4.
2. Hufnagel, C.A. and P.W. Conrad, *The direct approach for the correction of aortic insufficiency*. Jama, 1961. **178**: p. 275-9.
3. Harken, D.E., *Heart valves: ten commandments and still counting*. Ann Thorac Surg, 1989. **48**(3 Suppl): p. S18-9.
4. Rahimtoola, S.H., *Choice of prosthetic heart valve for adult patients*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**(6): p. 893-904.
5. Bloomfield, P., et al., *Twelve-year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses*. N Engl J Med, 1991. **324**(9): p. 573-9.
6. Oxenham, H., et al., *Twenty year comparison of a Bjork-Shiley mechanical heart valve with porcine bioprostheses*. Heart, 2003. **89**(7): p. 715-21.
7. Hammermeister, K., et al., *Outcomes 15 years after valve replacement with a mechanical versus a bioprosthetic valve: final report of the Veterans Affairs randomized trial*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(4): p. 1152-8.
8. Hammermeister, K.E., et al., *A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease*. N Engl J Med, 1993. **328**(18): p. 1289-96.
9. Tatoulis, J., S. Chaiyaroj, and J.A. Smith, *Aortic valve replacement in patients 50 years old or younger with the St. Jude Medical valve: 14-year experience*. J Heart Valve Dis, 1996. **5**(5): p. 491-7.
10. Cannegieter, S.C., F.R. Rosendaal, and E. Briet, *Thromboembolic and bleeding complications in patients with mechanical heart valve prostheses*. Circulation, 1994. **89**(2): p. 635-41.
11. Grunkemeier, G.L., et al., *Long-term performance of heart valve prostheses*. Curr Probl Cardiol, 2000. **25**(2): p. 73-154.
12. Renzulli, A., et al., *Acute thrombosis of prosthetic valves: a multivariate analysis of the risk factors for a lifethreatening event*. Eur J Cardiothorac Surg, 1992. **6**(8): p. 412-20; discussion 421.
13. van Geldorp, M.W., et al., *Patient outcome after aortic valve replacement with a mechanical or biological prosthesis: weighing lifetime anticoagulant-related event risk against reoperation risk*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **137**(4): p. 881-6, 886e1-5.
14. Burdon, T.A., et al., *Durability of porcine valves at fifteen years in a representative North American patient population*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1992. **103**(2): p. 238-51; discussion 251-2.
15. David, T.E., *Aortic valve replacement with stentless porcine bioprostheses*. J Card Surg, 1998. **13**(5): p. 344-51.
16. Glower, D.D., et al., *Determinants of 15-year outcome with 1,119 standard Carpentier-Edwards porcine valves*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(6 Suppl): p. S44-8.
17. Yun, K.L., et al., *Durability of the Hancock MO bioprosthesis compared with standard aortic valve bioprostheses*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(2 Suppl): p. S221-8.
18. Bach, D.S., et al., *Ten-year outcome after aortic valve replacement with the freestyle stentless bioprosthesis*. Ann Thorac Surg, 2005. **80**(2): p. 480-6; discussion 486-7.

19. Desai, N.D., et al., *Long-term results of aortic valve replacement with the St. Jude Toronto stentless porcine valve*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **78**(6): p. 2076-83; discussion 2076-83.
20. Puvimanasinghe, J.P., et al., *Prognosis after aortic valve replacement with a bioprosthesis: predictions based on meta-analysis and microsimulation*. *Circulation*, 2001. **103**(11): p. 1535-41.
21. Marquez, S., R.T. Hon, and A.P. Yoganathan, *Comparative hydrodynamic evaluation of bioprosthetic heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2001. **10**(6): p. 802-11.
22. Rao, V., et al., *Prosthesis-patient mismatch affects survival after aortic valve replacement*. *Circulation*, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III5-9.
23. Aupart, M.R., et al., *Perimount pericardial bioprosthesis for aortic calcified stenosis: 18-year experience with 1133 patients*. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(6): p. 768-75; discussion 775-6.
24. Puvimanasinghe, J.P., et al., *Prognosis after aortic valve replacement with the Carpentier-Edwards pericardial valve: use of microsimulation*. *Ann Thorac Surg*, 2005. **80**(3): p. 825-31.
25. O'Brien, M.F., et al., *A comparison of aortic valve replacement with viable cryopreserved and fresh allograft valves, with a note on chromosomal studies*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1987. **94**(6): p. 812-23.
26. O'Brien, M.F., et al., *Allograft aortic valve replacement: long-term comparative clinical analysis of the viable cryopreserved and antibiotic 4 degrees C stored valves*. *J Card Surg*, 1991. **6**(4 Suppl): p. 534-43.
27. O'Brien, M.F., et al., *The homograft aortic valve: a 29-year, 99.3% follow up of 1,022 valve replacements*. *J Heart Valve Dis*, 2001. **10**(3): p. 334-44; discussion 335.
28. Palka, P., et al., *Primary aortic valve replacement with cryopreserved aortic allograft: an echocardiographic follow-up study of 570 patients*. *Circulation*, 2002. **105**(1): p. 61-6.
29. Chambers, J.C., et al., *Pulmonary autograft procedure for aortic valve disease: long-term results of the pioneer series*. *Circulation*, 1997. **96**(7): p. 2206-14.
30. Bogers, A.J., et al., *Is a bicuspid aortic valve a risk factor for adverse outcome after an autograft procedure?* *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(6): p. 1998-2003.
31. Kouchoukos, N.T., et al., *The Ross procedure: long-term clinical and echocardiographic follow-up*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **78**(3): p. 773-81; discussion 773-81.
32. Elkins, R.C., et al., *Ross operation: 16-year experience*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2008. **136**(3): p. 623-30, 630 e1-5.
33. Kincaid, E.H., et al., *Dissection in a pulmonary autograft*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **77**(2): p. 707-8.
34. Takkenberg, J.J., et al., *The Ross procedure: a systematic review and meta-analysis*. *Circulation*, 2009. **119**(2): p. 222-8.
35. David, T.E., *Ross procedure at the crossroads*. *Circulation*, 2009. **119**(2): p. 207-9.
36. Hawkins, J.A., et al., *Class I and class II anti-HLA antibodies after implantation of cryopreserved allograft material in pediatric patients*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **119**(2): p. 324-30.
37. Hoekstra, F., et al., *Donor-specific cellular immune response against human cardiac valve allografts*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1996. **112**(2): p. 281-6.
38. Schmitz-Rixen, T., et al., *Immunosuppressive treatment of aortic allografts*. *J Vasc Surg*, 1988. **7**(1): p. 82-92.
39. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. *Science*, 1993. **260**(5110): p. 920-6.

40. Vacanti, J.P. and R. Langer, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. Lancet, 1999. **354 Suppl 1**: p. SI32-4.
41. Hopkins, R., *Cardiac surgeon's primer: tissue-engineered cardiac valves*. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 2007: p. 125-35.
42. MacArthur, B.D. and R.O. Oreffo, *Bridging the gap*. Nature, 2005. **433**(7021): p. 19.
43. Stock, U.A., et al., *Dynamics of extracellular matrix production and turnover in tissue engineered cardiovascular structures*. J Cell Biochem, 2001. **81**(2): p. 220-8.
44. Bader, A., et al., *Tissue engineering of heart valves--human endothelial cell seeding of detergent acellularized porcine valves*. Eur J Cardiothorac Surg, 1998. **14**(3): p. 279-84.
45. Courtman, D.W., et al., *Development of a pericardial acellular matrix biomaterial: biochemical and mechanical effects of cell extraction*. J Biomed Mater Res, 1994. **28**(6): p. 655-66.
46. Wilson, G.J., et al., *Acellular matrix: a biomaterials approach for coronary artery bypass and heart valve replacement*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(2 Suppl): p. S353-8.
47. Schenke-Layland, K., et al., *Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals--an in vitro study*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(3): p. 497-509.
48. Steinhoff, G., et al., *Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue*. Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III50-5.
49. Stamm, C., et al., *Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering*. Ann Thorac Surg, 2004. **78**(6): p. 2084-92; discussion 2092-3.
50. Simon, P., et al., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **23**(6): p. 1002-6; discussion 1006.
51. Booth, C., et al., *Tissue engineering of cardiac valve prostheses I: development and histological characterization of an acellular porcine scaffold*. J Heart Valve Dis, 2002. **11**(4): p. 457-62.
52. Korossis, S.A., et al., *Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves*. J Heart Valve Dis, 2002. **11**(4): p. 463-71.
53. Rieder, E., et al., *Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells*. Circulation, 2005. **111**(21): p. 2792-7.
54. Wilcox, H.E., et al., *Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(2): p. 228-36; discussion 236-7.
55. Allaire, E., et al., *The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts*. Surgery, 1997. **122**(1): p. 73-81.
56. Allaire, E., et al., *Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats*. J Vasc Surg, 1994. **19**(3): p. 446-56.
57. Kasimir, M.T., et al., *Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves*. J Heart Valve Dis, 2006. **15**(2): p. 278-86; discussion 286.
58. Leyh, R.G., et al., *In vivo repopulation of xenogeneic and allogeneic acellular valve matrix conduits in the pulmonary circulation*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(5): p. 1457-63; discussion 1463.

59. Agrawal, C.M. and R.B. Ray, *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*. J Biomed Mater Res, 2001. **55**(2): p. 141-50.
60. Shinoka, T., et al., *Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model*. Ann Thorac Surg, 1995. **60**(6 Suppl): p. S513-6.
61. Shinoka, T., et al., *Tissue-engineered heart valves. Autologous valve leaflet replacement study in a lamb model*. Circulation, 1996. **94**(9 Suppl): p. II164-8.
62. Shinoka, T., et al., *Creation of viable pulmonary artery autografts through tissue engineering*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998. **115**(3): p. 536-45; discussion 545-6.
63. Sodian, R., et al., *Fabrication of a trileaflet heart valve scaffold from a polyhydroxyalkanoate biopolyester for use in tissue engineering*. Tissue Eng, 2000. **6**(2): p. 183-8.
64. Sodian, R., et al., *Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves*. Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III22-9.
65. Sodian, R., et al., *Application of stereolithography for scaffold fabrication for tissue engineered heart valves*. Asaio J, 2002. **48**(1): p. 12-6.
66. Stock, U.A., et al., *Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2000. **119**(4 Pt 1): p. 732-40.
67. Hoerstrup, S.P., et al., *Functional living trileaflet heart valves grown in vitro*. Circulation, 2000. **102**(19 Suppl 3): p. III44-9.
68. Rabkin, E., et al., *Evolution of cell phenotype and extracellular matrix in tissue-engineered heart valves during in-vitro maturation and in-vivo remodeling*. J Heart Valve Dis, 2002. **11**(3): p. 308-14; discussion 314.
69. Lichtenberg, A., et al., *Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions*. Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I559-65.
70. Hoerstrup, S.P., et al., *Fluorescence activated cell sorting: a reliable method in tissue engineering of a bioprosthetic heart valve*. Ann Thorac Surg, 1998. **66**(5): p. 1653-7.
71. Zund, G., et al., *Tissue engineering: a new approach in cardiovascular surgery: Seeding of human fibroblasts followed by human endothelial cells on resorbable mesh*. Eur J Cardiothorac Surg, 1998. **13**(2): p. 160-4.
72. Schnell, A.M., et al., *Optimal cell source for cardiovascular tissue engineering: venous vs. aortic human myofibroblasts*. Thorac Cardiovasc Surg, 2001. **49**(4): p. 221-5.
73. Perry, T.E., et al., *Thoracic Surgery Directors Association Award. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves*. Ann Thorac Surg, 2003. **75**(3): p. 761-7; discussion 767.
74. Hoerstrup, S.P., et al., *Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells*. Circulation, 2002. **106**(12 Suppl 1): p. I143-50.
75. Sarugaser, R., et al., *Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors*. Stem Cells, 2005. **23**(2): p. 220-9.
76. Wang, H.S., et al., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1330-7.
77. Hoerstrup, S.P., et al., *Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells*. Ann Thorac Surg, 2002. **74**(1): p. 46-52; discussion 52.
78. Kadner, A., et al., *Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study*. Eur J Cardiothorac Surg, 2004. **25**(4): p. 635-41.
79. Schmidt, D., et al., *Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells*. Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(5): p. 795-800.

80. Schmidt, D., et al., *Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors*. *Circulation*, 2006. **114**(1 Suppl): p. I125-31.
81. Asahara, T., et al., *Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization*. *Circ Res*, 1999. **85**(3): p. 221-8.
82. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. *Science*, 1997. **275**(5302): p. 964-7.
83. Kaushal, S., et al., *Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo*. *Nat Med*, 2001. **7**(9): p. 1035-40.
84. Dvorin, E.L., et al., *Quantitative evaluation of endothelial progenitors and cardiac valve endothelial cells: proliferation and differentiation on poly-glycolic acid/poly-4-hydroxybutyrate scaffold in response to vascular endothelial growth factor and transforming growth factor beta1*. *Tissue Eng*, 2003. **9**(3): p. 487-93.
85. Schmidt, D., et al., *Umbilical cord blood derived endothelial progenitor cells for tissue engineering of vascular grafts*. *Ann Thorac Surg*, 2004. **78**(6): p. 2094-8.
86. Schmidt, D., U.A. Stock, and S.P. Hoerstrup, *Tissue engineering of heart valves using decellularized xenogeneic or polymeric starter matrices*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. **362**(1484): p. 1505-12.
87. Sacks, M.S. and A.P. Yoganathan, *Heart valve function: a biomechanical perspective*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2007. **362**(1484): p. 1369-91.
88. Schoen, F.J., *Evolving concepts of cardiac valve dynamics: the continuum of development, functional structure, pathobiology, and tissue engineering*. *Circulation*, 2008. **118**(18): p. 1864-80.
89. Niklason, L.E., et al., *Functional arteries grown in vitro*. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 489-93.
90. Butcher, J.T., et al., *Unique morphology and focal adhesion development of valvular endothelial cells in static and fluid flow environments*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(8): p. 1429-34.
91. Jin, Z.G., et al., *Flow shear stress stimulates Gab1 tyrosine phosphorylation to mediate protein kinase B and endothelial nitric-oxide synthase activation in endothelial cells*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(13): p. 12305-9.
92. Noris, M., et al., *Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions*. *Circ Res*, 1995. **76**(4): p. 536-43.
93. Pompilio, G., et al., *Endothelial-dependent dynamic and antithrombotic properties of porcine aortic and pulmonary valves*. *Ann Thorac Surg*, 1998. **65**(4): p. 986-92.
94. Syedain, Z.H. and R.T. Tranquillo, *Controlled cyclic stretch bioreactor for tissue-engineered heart valves*. *Biomaterials*, 2009. **30**(25): p. 4078-84.
95. Lichtenberg, A., et al., *Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves*. *J Heart Valve Dis*, 2006. **15**(2): p. 287-93; discussion 293-4.
96. Dohmen, P.M., et al., *Ross operation with a tissue-engineered heart valve*. *Ann Thorac Surg*, 2002. **74**(5): p. 1438-42.
97. Dohmen, P.M., et al., *Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure*. *Ann Thorac Surg*, 2007. **84**(3): p. 729-36.
98. Goldstein, S., et al., *Transpecies heart valve transplant: advanced studies of a bioengineered xeno-autograft*. *Ann Thorac Surg*, 2000. **70**(6): p. 1962-9.
99. O'Brien, M.F., et al., *The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation*. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 1999. **11**(4 Suppl 1): p. 194-200.

100. Bechtel, J.F., U. Stierle, and H.H. Sievers, *Fifty-two months' mean follow up of decellularized SynerGraft-treated pulmonary valve allografts*. J Heart Valve Dis, 2008. **17**(1): p. 98-104; discussion 104.
101. Ali, M.L., et al., *The sheep as an animal model for heart valve research*. Cardiovasc Surg, 1996. **4**(4): p. 543-9.
102. Kawada, H. and M. Ogawa, *Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle*. Blood, 2001. **98**(7): p. 2008-13.
103. Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, and T. Kai, *Stem cells find their niche*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 98-104.
104. Shi, Q., et al., *Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(2): p. 362-7.
105. Rieder, E., et al., *Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **127**(2): p. 399-405.
106. Sayk, F., et al., *Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study*. Ann Thorac Surg, 2005. **79**(5): p. 1755-8.
107. Goncalves, A.C., et al., *Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens*. J Heart Valve Dis, 2005. **14**(2): p. 212-7.
108. Iwanaga, K., et al., *Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(4): p. 1353-9.
109. Minatoguchi, S., et al., *Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment*. Circulation, 2004. **109**(21): p. 2572-80.
110. Norol, F., et al., *Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model*. Blood, 2003. **102**(13): p. 4361-8.
111. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(18): p. 10344-9.
112. Bhattacharya, V., et al., *Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances endothelialization and microvessel formation in small-caliber synthetic vascular grafts*. J Vasc Surg, 2000. **32**(1): p. 116-23.
113. Powell, T.M., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(2): p. 296-301.
114. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
115. Friedenstein, A.J., et al., *Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo*. Transplantation, 1974. **17**(4): p. 331-40.
116. Makino, S., et al., *Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro*. J Clin Invest, 1999. **103**(5): p. 697-705.
117. Ku, C.H., et al., *Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch*. Cardiovasc Res, 2006. **71**(3): p. 548-56.
118. Kurpinski, K., et al., *Regulation of vascular smooth muscle cells and mesenchymal stem cells by mechanical strain*. Mol Cell Biomech, 2006. **3**(1): p. 21-34.
119. Pittenger, M.F. and B.J. Martin, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 2004. **95**(1): p. 9-20.

120. Kim, D.H., et al., *Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell*. Cytokine, 2005. **31**(2): p. 119-26.
121. Kinnaird, T., et al., *Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms*. Circ Res, 2004. **94**(5): p. 678-85.
122. Fazel, S., et al., *Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(5): p. 1310.
123. Fedak, P.W., et al., *Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005. **130**(5): p. 1430-9.
124. Therrien, J., et al., *Optimal timing for pulmonary valve replacement in adults after tetralogy of Fallot repair*. Am J Cardiol, 2005. **95**(6): p. 779-82.
125. Gatzoulis, M.A., et al., *Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot: a multicentre study*. Lancet, 2000. **356**(9234): p. 975-81.
126. Bonhoeffer, P., et al., *Percutaneous insertion of the pulmonary valve*. J Am Coll Cardiol, 2002. **39**(10): p. 1664-9.
127. Bonhoeffer, P., et al., *Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction*. Lancet, 2000. **356**(9239): p. 1403-5.
128. Khambadkone, S., et al., *Percutaneous pulmonary valve implantation in humans: results in 59 consecutive patients*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1189-97.
129. Zhou, J.Q., et al., *Self-expandable valved stent of large size: off-bypass implantation in pulmonary position*. Eur J Cardiothorac Surg, 2003. **24**(2): p. 212-6.
130. Huber, C.H. and L.K. von Segesser, *Direct access valve replacement (DAVR) - are we entering a new era in cardiac surgery?* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **29**(3): p. 380-5.
131. Berdat, P.A. and T. Carrel, *Off-pump pulmonary valve replacement with the new Shelhigh Injectable Stented Pulmonic Valve*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(5): p. 1192-3.
132. Schreiber, C., et al., *A new treatment option for pulmonary valvar insufficiency: first experiences with implantation of a self-expanding stented valve without use of cardiopulmonary bypass*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **31**(1): p. 26-30.
133. Chen, A.M. and M.D. Scott, *Immunocamouflage: prevention of transfusion-induced graft-versus-host disease via polymer grafting of donor cells*. J Biomed Mater Res A, 2003. **67**(2): p. 626-36.
134. Eugene, M., *Polyethyleneglycols and immunocamouflage of the cells tissues and organs for transplantation*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2004. **50**(3): p. 209-15.
135. Dohmen, P.M., et al., *Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding?* J Heart Valve Dis, 2006. **15**(6): p. 823-9.
136. Ye, X., et al., *Enhancement of mesenchymal stem cell attachment to decellularized porcine aortic valve scaffold by in vitro coating with antibody against CD90: a preliminary study on antibody-modified tissue-engineered heart valve*. Tissue Eng Part A, 2009. **15**(1): p. 1-11.

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: Deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor

Francis Juthier, André Vincentelli, Julien Gaudric, Delphine Corseaux, Olivier Fouquet, Christine Calet, Thierry Le Tourneau, Valérie Soenen, Christophe Zawadzki, Olivier Fabre, Sophie Susen, Alain Prat and Brigitte Jude

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:843-852

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.11.037

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/131/4/843>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2006 American Association for Thoracic Surgery

Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: Deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor

Francis Juthier, MD,^{a,b} André Vincentelli, MD, PhD,^{a,b} Julien Gaudric, MD,^{a,b} Delphine Corseaux, PhD,^a Olivier Fouquet, MD,^{a,b} Christine Calet, MD,^{a,b} Thierry Le Tourneau, MD, PhD,^a Valérie Soenen, BS,^c Christophe Zawadzki, BS,^{a,c} Olivier Fabre, MD,^{a,b} Sophie Susen, MD,^{a,c} Alain Prat, MD,^{a,b} and Brigitte Jude, MD, PhD^{a,c}

Background: Autologous recellularization of decellularized heart valve scaffolds is a promising challenge in the field of tissue-engineered heart valves and could be boosted by bone marrow progenitor cell mobilization. The aim of this study was to examine the spontaneous in vivo recolonization potential of xenogeneic decellularized heart valves in a lamb model and the effects of granulocyte colony-stimulating factor mobilization of bone marrow cells on this process.

Methods: Decellularized porcine aortic valves were implanted in 12 lambs. Six lambs received granulocyte colony-stimulating factor ($10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 7 days, granulocyte colony-stimulating factor group), and 6 received no granulocyte colony-stimulating factor (control group). Additionally, nondecellularized porcine valves were implanted in 5 lambs (xenograft group). Angiographic and histologic evaluation was performed at 3, 6, 8, and 16 weeks.

Results: Few macroscopic modifications of leaflets and the aortic wall were observed in the control group, whereas progressive shrinkage and thickening of the leaflets appeared in the granulocyte colony-stimulating factor and xenograft groups. In the 3 groups progressive ovine cell infiltration (fluorescence in situ hybridization) was observed in the leaflets and in the adventitia and the intima of the aortic wall but not in the media. Neointimal proliferation of α -actin-positive cells, inflammatory infiltration, adventitial neovascularization, and calcifications were more important in the xenograft and the granulocyte colony-stimulating factor groups than in the control group. Continuous re-endothelialization appeared only in the control group.

Conclusion: Decellularized xenogeneic heart valve scaffolds allowed partial autologous recellularization. Granulocyte colony-stimulating factor led to accelerated heart valve deterioration similar to that observed in nondecellularized xenogeneic cardiac bioprostheses.

Clinically available cardiac valve prostheses have long-term limitations, including the need for lifelong anticoagulation for mechanical prosthesis and limited durability for bioprostheses.¹ Tissue engineering could create an ideal valve, with physiologic hemodynamic behavior, low immunogenic potential,

From Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm) ERI-9, Faculté de Médecine,^a Lille, France, the Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, Clinique de Chirurgie Cardiovasculaire,^b Lille, France, and Institut d'Hématologie-Transfusion,^c Lille, France

Supported in part by grants from the French Fond National pour la Science, Ministère de la Recherche, Action Concertée Incitative 2002-Grant 02TS 050 and from Conseil Régional Nord Pas de Calais 2003-OBJ2-2004/1-4-1, no. 157.

Received for publication Aug 5, 2005; revisions received Nov 20, 2005; accepted for publication Nov 28, 2005.

Address for reprints: André Vincentelli, MD, PhD, Clinique de Chirurgie Cardiovasculaire, Hôpital Cardiologique, 59037 Lille cedex (E-mail: a-vincentelli@chru-lille.fr).

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:843-52
0022-5223/\$32.00

Copyright © 2006 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2005.11.037

Abbreviations and Acronyms

| | |
|-------|---|
| BM | = bone marrow |
| G-CSF | = granulocyte colony-stimulating factor |
| VWF | = Von Willebrand Factor |

and repair, remodeling, and growing capabilities. Several groups demonstrated the feasibility of creating living valves *in vitro* through seeding autologous cells on various scaffolds, such as synthetic polymers, collagen, and allogeneic or xenogeneic valve conduits.²⁻⁴ Xenogeneic natural scaffolds have the advantage of adequate anatomic structure and unlimited availability. However, they can trigger deleterious immune responses, especially cell-mediated ones. Decellularization of xenogeneic valve matrices reduces their antigenicity, and recent *in vitro* studies suggest that decellularized porcine valve matrices are a suitable scaffold for recolonization by smooth muscle cells.⁵

The strategy to promote the recolonizing process remains questionable. First experiments were conducted with differentiated vascular cells (endothelial cells or smooth muscle cells) obtained from samples of saphenous veins or autologous carotid arteries.^{2,6} More recently, bone marrow (BM) cells have been demonstrated to contain various progenitor cells, such as endothelial progenitors and mesenchymal lineage cells, which can induce tissue regeneration when injected into cardiovascular structures.⁷ Cardiac valve interstitial cells are myofibroblasts of mesenchymal origin, and it was demonstrated that BM cells could recolonize synthetic valve scaffolds *in vitro*, thus confirming that BM cells contain proper cell progenitors for heart valve reconstruction.^{8,9}

Early BM progenitor cells can be mobilized by growth factors, such as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), into peripheral blood. Numerous experimental studies have shown that G-CSF-mobilized BM cells are able to home to injured cardiovascular tissues and contribute to tissue regeneration, especially in infarcted myocardium and hind-limb ischemic areas.^{10,11}

The aim of this study was to examine the spontaneous *in vivo* recolonization potential of xenogeneic decellularized heart valves in a lamb model and the effects of G-CSF mobilization of BM cells on this process.

Methods**Sampling and Decellularization of Porcine Aortic Valves**

Aortic valve conduits were sampled from pigs (Large white/Landras, 10-15 kg of body weight). The animals were anesthetized by means of intravenous injection of propofol, 20 mg/kg, and sufentanil, 1 μ g/kg. After median sternotomy, the heart was explanted under surgical conditions. Aortic valve conduits were harvested with a thin ridge of subvalvular muscle tissue proximally and a short arterial segment distally. Then porcine valve conduits

were calibrated with a Hegar dilatator, weighed, and washed in Hank's balanced salt solution plus aprotinin (10 KIU/mL), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and nystatin (100 U/mL) plus N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (10 mmol/L) at pH 7.6. Valve conduits were decellularized through a nonenzymatic procedure, associating hypotonic shock and low-concentration ionic detergent, as previously described.^{12,13} Briefly, valve conduits were incubated at 20°C during constant stirring in hypotonic buffer (Tris, 10 mmol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8) for 14 hours and hypotonic buffer with sodium dodecylsulfate (0.1%) for 24 hours, washed in isotonic buffer (Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; ethylenediamine tetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8) for 24 hours, and then immediately implanted in lambs. Moreover, additional porcine valve conduits were sampled and stored in Hank's balanced salt solution plus aprotinin (10 KIU/mL), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and nystatin (100 U/mL) plus N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (10 mmol/L) at pH 7.6 for 72 hours at room temperature without any decellularization process. In all valves sterility controls were realized on the last washing solution.

Study Design

In 17 lambs (Romanov/Ile de France; aged 12-16 weeks; median weight, 23 kg) a porcine aortic valve conduit was implanted in the descending thoracic aorta. Five lambs received a nondecellularized porcine valve (xenograft group). Twelve lambs received a decellularized porcine valve. Among them, 6 received subcutaneous injections of G-CSF (Neupogen, a kind gift from Amgen Laboratories) (10 μ g/kg for 7 days, from day 3 before to day 3 after the operation; G-CSF group), and 6 received no G-CSF (control group).

Surgical Techniques

In all animals general anesthesia was induced and maintained by means of intravenous injection of propofol, 20 mg/kg, and sufentanil, 1 μ g/kg. All animals were operated on by the same team of surgeons (AV and FJ). The descending aorta was exposed through a left anterolateral thoracotomy, entering the chest through the fourth intercostal space. The aorta was dissected and exposed at the level of the isthmus. Two 4-0 monofilament purse strings were made on the aortic arch and distally on the descending aorta (Prolene, Ethicon, Inc). Systemic anticoagulation was induced with heparin (200 UI/kg), and a 14-mm diameter pediatric gastric tube was implanted between the aortic arch and the thoracic descending aorta as an aorticoaortic shunt. Then the aorta was crossclamped proximally immediately after the origin of the left subclavian artery and 15 cm distally. The descending aorta was transected, and the porcine aortic valve conduit was inserted with 2 end-to-end 4-0 monofilament running sutures. On completion of the operation, heparin was reversed with protamine (200 UI/kg). The chest was closed in layers, and a chest tube was inserted. The chest tube was removed after extubation. Animals were then settled in standard conditions, with food and drink *ad libitum*. All animals received 1000 mg of ceftriaxone and 500 mg of aspirin for the first postoperative week on a daily basis. For pain control, during the first 2 operative days, a transdermal fentanyl patch

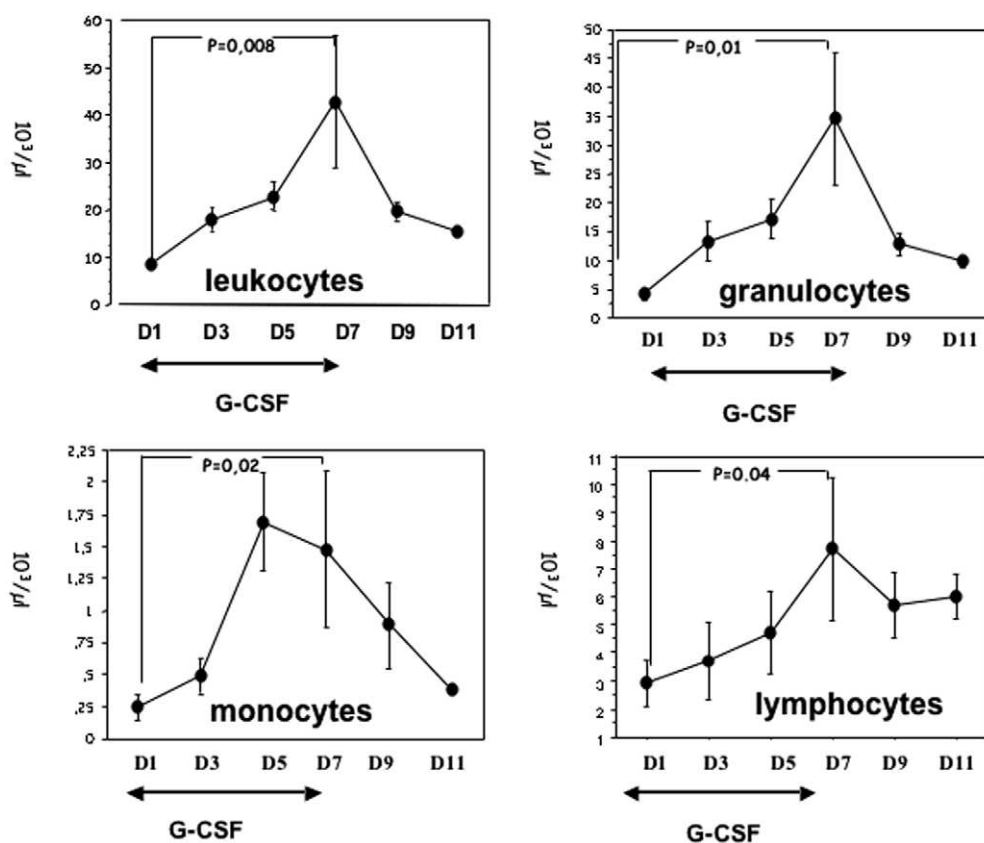


Figure 1. Kinetics of white blood cell counts in lambs after subcutaneous injection of recombinant human G-CSF (10 µg/kg) for 7 days.

was applied on the chest. All the animals received humane care in compliance with the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" published by the National Institutes of Health (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised 1985).

Valve Follow-up and Explantation Process

In each group euthanasia was performed in one lamb at 3, 6, and 8 weeks and in the remaining animals at 16 weeks after implantation. Euthanasia was performed under the same protocol of analgesia and anesthetic procedures as for implantation. Before termination, heparin (300 UI/kg) was administered, and an aortography was realized in each animal after catheterization of the femoral artery to detect graft abnormalities (thrombosis, aneurysm, and stenosis) and to measure the transvalvular gradient. Grafts were explanted together with the descending thoracic aorta.

Valve Analysis

Explanted valve conduits were grossly examined. Aneurysmal aortic dilatation, thickness, and retraction of the cusps and the presence of visible calcifications were reported. Then fragments from the grafted aortic wall and cusps were sampled for cytologic analysis of colonizing cells and histologic analysis.

For histology, samples were fixed in a buffered 4% formaldehyde solution, dehydrated, and embedded in paraffin. Sections (6 µm) were stained with hematoxylin, eosin, and safran and with Masson trichrome. For analysis of the intima/media ratio, computed planimetry was realized through Perfect Image 7.10 software (Clara Vision). In addition, orcein staining for elastic fibers and Von Kossa staining for calcium were performed.

Immunostaining of the paraffin sections was done with monoclonal antibody to α -actin (1:20, 1 night at +4°C) or with polyclonal antibody to VWF (1:500, 2 hours at room temperature; DAKO) and respective isotope-matched IgG control (Cymbus Biotechnology). The immunoreaction was detected with alkaline phosphatase for α -actin and with Avidin Biotin performed Complex peroxidase for VWF. The tissue sections were analyzed by 2 independent observers (DC and BJ) who were blinded to the animal group allocation.

Cytologic Analysis and Molecular Probes

For cell isolation, tissue samples were digested for 45 minutes at 37°C in a solution containing type I collagenase, elastase, and soybean trypsin inhibitor. After addition of 30% fetal calf serum, cytocentrifuged preparations were made and frozen at -70°C. Fluorescence in situ hybridization was performed with a bacterial artificial chromosome (BAC 31EA; a kind gift of Dr François

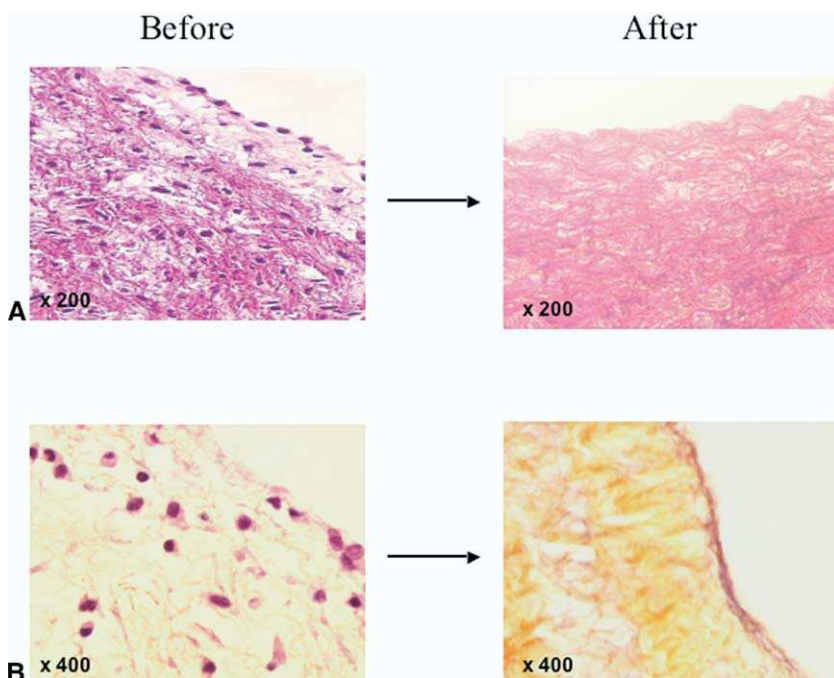


Figure 2. Results of the decellularization process (hematoxylin, eosin, and safran staining). Before and after decellularization: A, native valve conduit; B, leaflet. A complete decellularization of the aortic wall and of the leaflets without destruction of the fibrous structure is shown.

Piumi, Institut National de Recherche Agronomique, Jouy en Josas, France) to detect the presence of cells of ovine origin in the samples. The ovine pancentromeric probe was labeled in red by means of nick-translation (Spectrum Red dUTP and Nick Translation Reagent kit, Vysis Inc). The slides were fixed, treated with mild pepsin solution, and dehydrated. After denaturation, identification of the centromeres was performed by means of overnight hybridization at 37°C. After washing, DNA was counterstained in blue with 4',6 diamino-2-phenylindole. A red labeling of the chromosomes was observed in all ovine cells, and no labeling was observed in porcine cells.

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with Statview software (SAS Institute Inc). Continuous variables were expressed as means \pm standard deviations. The Wilcoxon test was used to compare individual blood cell values over the time course of the experiments. The Kruskal-Wallis test was used to analyze differences in the intima/media ratio among the 3 groups.

Results

Effects of G-CSF on Lamb White Blood Cell Counts

Because the effects of recombinant human G-CSF in lambs had not been reported yet, we first tested the kinetics of peripheral white blood cell counts after G-CSF administration in 4 lambs. A daily subcutaneous injection of 10 μ g/kg G-CSF was performed for 7 days, and blood sampling was performed every 2 days. An increase in all white cell counts was observed as soon as 2 days after injection and was maximal at day 7 (Figure 1). The mean counts of leukocytes, granulocytes, monocytes, and lymphocytes at day 7

exceeded baseline values by 5-, 8.6-, 4.6-, and 2.6-fold, respectively ($P \leq .04$).

Results of the Decellularization Process on Aortic Valve Conduits

The decellularization process did not induce macroscopic modifications of the valve conduits. Histologic analysis showed no remaining cells in the cusps and rare pyknotic nucleus in the deepest part of the media and in the boarding myocardial tissue. The organization of collagen fibers was similar to that of a native valve conduit (Figure 2). Valve conduits were equally decellularized in the control group and in the G-CSF group before implantation.

Valve Follow-up and Outcome

Angiography showed no aneurysmal dilatation or stenosis at any time in all 3 groups, except in one animal in the xenograft group that exhibited valve thrombosis at 6 weeks (Figure 3). In all other cases, no hemodynamic abnormality was observed. In particular, no transvalvular gradient or systemic hypertension was observed in any animal. In the xenograft and the G-CSF groups, gross observation of the valves showed calcifications of the leaflets and of the aortic wall, leaflet thickening, and shrinkage at 6, 8, and 16 weeks. None of these lesions were observed in the decellularized group (Figure 4).

Histologic and Cytologic Analysis

Representative histologic features of the 3 groups at 16 weeks are shown in Figures 5 and 6 (top row, control group;

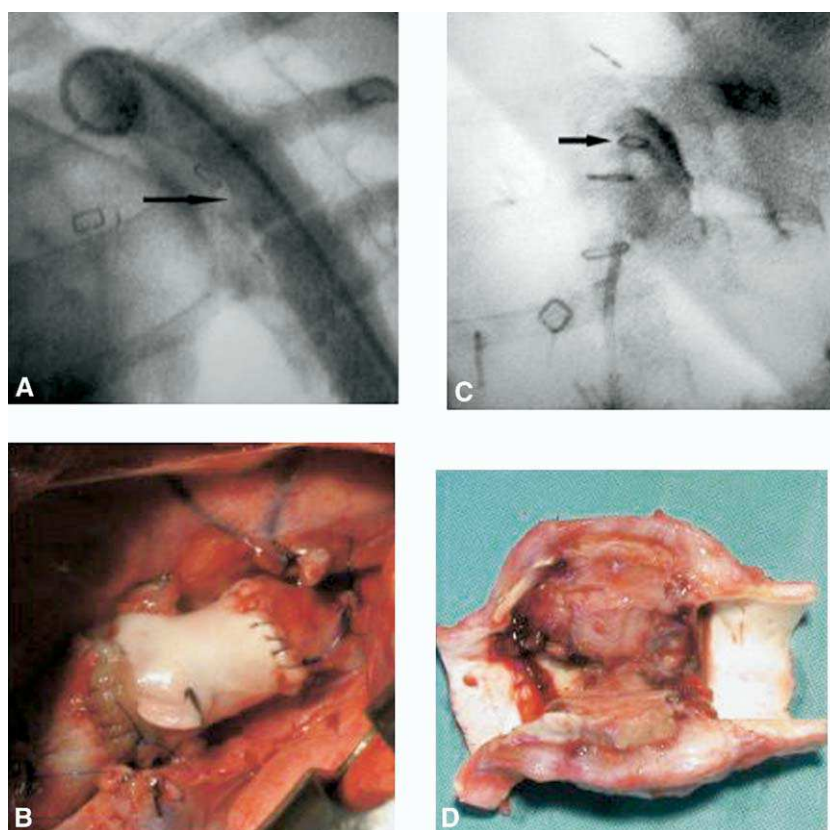


Figure 3. A and B, Representative aspects of normal aortography (A) at 16 weeks and perioperative aspect of the graft in the thoracic descending aorta (B). C and D, Specific aspect of the 16 weeks after implantation aortography (C) and of the explanted valve (D) in the animal that underwent complete valve thrombosis (xenograft group). Arrows indicate site of the graft implantation.

middle row, G-CSF group; and bottom row, xenograft group). In the control group inflammatory cell infiltration and few small vessels were observed in the adventitia after 3 weeks but remained limited and did not increase during follow-up (Figure 5, A and B). A progressive neointimal thickening appeared after 6 weeks and increased up to 16 weeks (Figure 5, C). α -Actin staining showed numerous positive cells in the neointima (Figure 5, D). No cell was visible in the media at any time. No modification of the elastic fibers was observed (orcein staining; Figure 6, A). Rare microcalcifications appeared after 16 weeks in the junction between adventitia and media (Von Kossa staining; Figure 6, B). A continuous endothelial layer was seen on the luminal surface after 6 weeks and up to 16 weeks on the aortic wall and the leaflets (VWF staining; Figure 6, C). Few cells were observed in the leaflets (Figure 6, D), some of them being positive for α -actin staining.

In the G-CSF group a progressive inflammatory infiltration appeared in the adventitia at 3 weeks, which increased with time and was associated with the development of numerous neovessels at 16 weeks (Figure 5, A and B) and of

a marked neointimal proliferation of α -actin-positive cells (Figure 5, C and D). Necrotic zones were visible in the media, which remained acellular. Elastic fibers exhibited a progressive disorganization, thickening, and fragmentation (orcein staining; Figure 6, A). Von Kossa staining showed microcalcifications in the aortic wall and in the leaflets after 6 weeks. Elastic fiber disorganization and heavy calcifications at the adventitia-media and the media-neointima junctions were observed (Figure 6, B). VWF staining showed only a discontinuous endothelial cell layer on the luminal surface (Figure 6, C). Necrosis and inflammatory infiltration was also visible in the leaflets associated with calcifications (Figure 6, D).

In the xenograft group a marked inflammatory infiltration and neovascularization was observed in the adventitia as soon as after 3 weeks and increased up to 16 weeks (Figure 5, A and B). Calcifications were visible as soon as 6 weeks. At 16 weeks, the aortic wall and leaflets exhibited features similar to those of the G-CSF group, with marked neointimal thickening (Figure 5, C and D), disorganization of elastic fibers (Figure 6, A), calcifications both in the

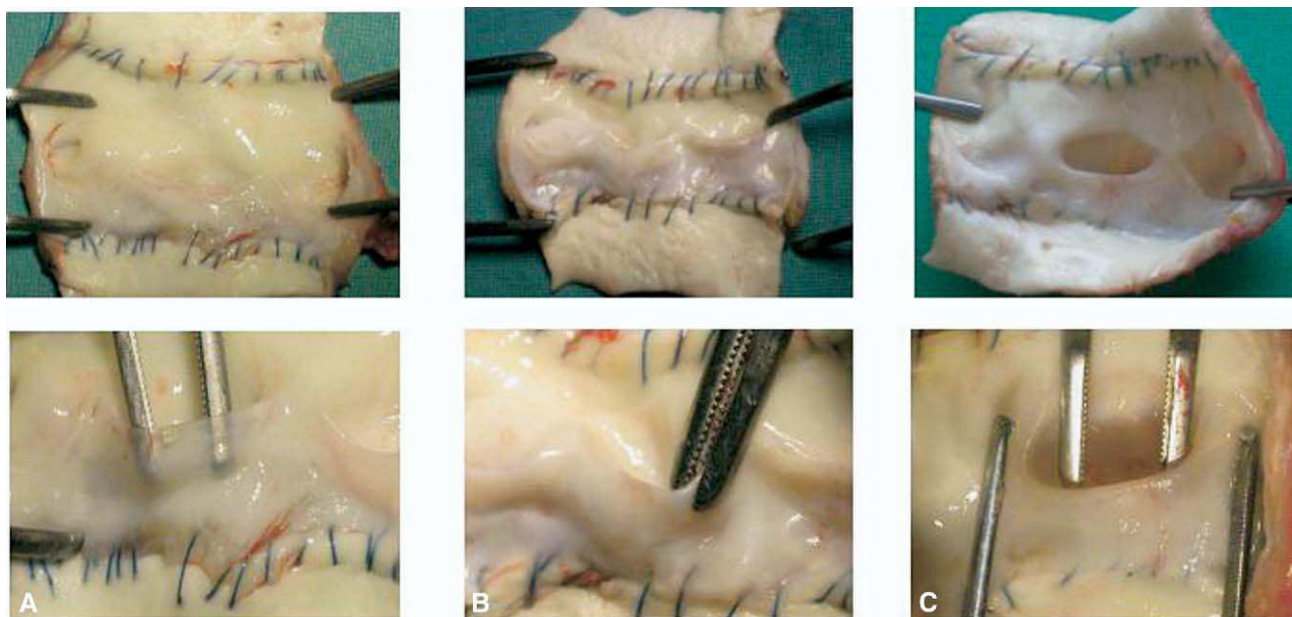


Figure 4. Macroscopic examination at 16 weeks. A, Control group; B, G-CSF group; C, Xenograft group. In the xenograft and the G-CSF groups, but not in the control group, gross observation showed calcifications of the leaflets and of the aortic wall, leaflet thickening, and shrinkage at 16 weeks.

aortic wall and the leaflets (Figure 6, B and D), and discontinuous endothelialization (Figure 6, C).

Comparison of the neointima/media thickness showed that the intima/media ratio increased continuously with time in the 3 groups. This increase was more rapid and pronounced in the xenograft group and the G-CSF group than in the decellularized group at 3 weeks (Figure 7). However, at 16 weeks, the intima/media ratio tended to be the same in the 3 groups.

All the cells eluted from the grafted decellularized valves were stained by the centromeric probe, demonstrating their autologous ovine origin (Figure 8).

Discussion

In this study decellularized porcine valve scaffolds implanted in juvenile sheep exhibited good mechanical resistance under high systemic strain after 16 weeks and were partially recolonized by ovine cells in the leaflets and the aortic wall. The healing process led to the formation of a neointimal proliferation generated by ovine smooth muscle cells. Treatment with G-CSF did not improve scaffold recolonization but rather induced accelerated deterioration of the valve, which was similar to the xenograft rejection process observed in nondecellularized porcine valves.

As a biologic extracellular matrix scaffold, we chose porcine heart valves for their well-known good hemodynamic behavior and unlimited availability. When used as valve prostheses, these porcine scaffolds are usually treated with glutaraldehyde to improve mechanical properties and

to limit the xenogeneic rejection process. However, glutaraldehyde treatment profoundly modifies the extracellular matrix structure and makes it improper to support cell migration, recolonization, and the matrix-renewing process.¹⁴ Decellularization of porcine valves is another approach to limit cell-mediated xenograft rejection and potentially facilitate recolonization by interstitial cells. Several decellularization processes have been described, leading to important differences in the efficiency of cell removal, long-term mechanical properties, and xenoantigen residual exposition.^{15,16} It is noteworthy that in a series of 4 young patients, enzymatic decellularization of porcine grafts have shown severe drawbacks associated with catastrophic clinical results, such as rapid graft failure, that were responsible for the death of two thirds of the patients.^{17,18} By contrast, homografts decellularized with the same enzymatic process (Synergraft, Cryolife Inc) and implanted in adults have shown better outcome.¹⁹ Furthermore, the postmortem analysis of a Synergraft-treated homograft explanted 5 weeks after implantation in a 60-year-old patient showed preserved morphology, although associated with inflammatory infiltration.²⁰ In our study we used porcine xenografts decellularized through a nonenzymatic process on the basis of osmotic shock, detergent cell extraction (0.1% sodium dodecylsulfate), and antiproteases recently described by Korossis and colleagues,¹² which induced complete decellularization without major impairment of the structural proteins. Under that process, valve conduit tissues had equal strength compared with fresh tissues and only modest changes in extensibility

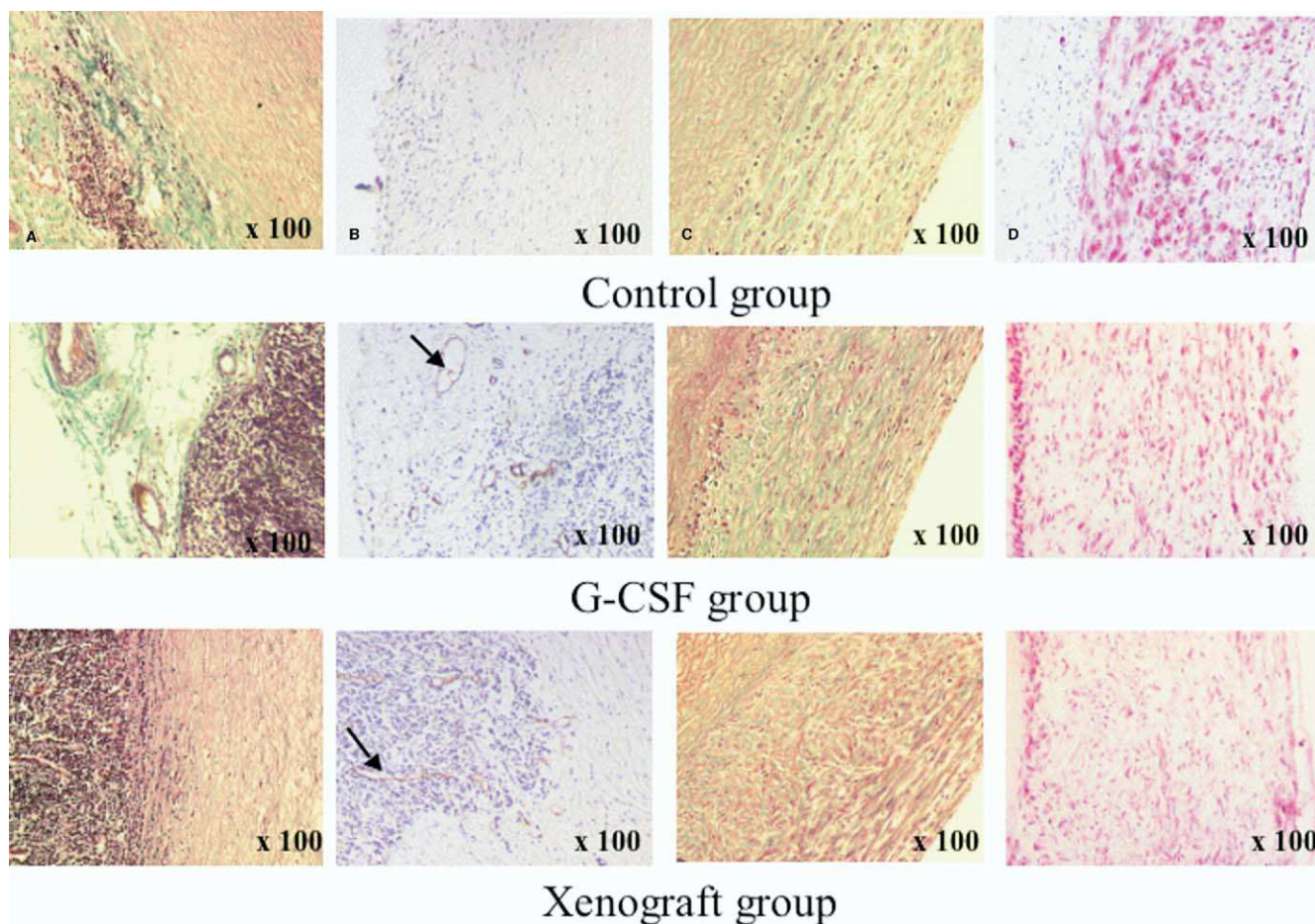


Figure 5. Representative histologic aspects in the grafted aortic wall at 16 weeks in the 3 groups (top row, control group; middle row, G-CSF group; bottom row, xenograft group). **A**, Adventitia (Masson trichrome staining): collagen fibers and limited infiltration by inflammatory cells were visible in the control group. Inflammatory cells were more prominent in the G-CSF and xenograft groups than in the control group. **B** (anti-VWF antibody), Adventitial neovascularization (*arrows*) was limited in the control group and abundant in the G-CSF and xenograft groups. **C** (Masson trichrome staining), Neointimal proliferation tended to be more important in the G-CSF and xenograft groups than in the control group. **D** (anti- α -actin staining), Evidence of strong α -actin staining in the neointimal layer in the 3 groups.

in vitro.¹³ In addition, this process was recently demonstrated to remove xenoantigens.²¹ Using that protocol, we observed a complete tissue decellularization before implantation, and this observation was further confirmed after explantation because all the cells eluted from the explanted valves were positive for the ovine centromeric probe, demonstrating their ovine origin.

Such decellularized scaffolds were recently demonstrated in vitro to allow cell recolonization by smooth muscle cells without cytotoxicity.⁵ Our study analyzes for the first time the ability of this decellularized scaffold to be recolonized in vivo by nonporcine cells. Because high mechanical forces must be sustained by the aortic valve conduit, we implanted the scaffolds in the descending aorta of

lambs to evaluate its resistance to physiologic strains in vivo. As previously reported by Korossis and colleagues¹² in vitro, we observed that these scaffolds have a good mechanical resistance in vivo, with no aneurysm formation and no rupture. We chose, in this study, to implant the porcine scaffolds in the descending aorta of lambs, where systemic strains are very high. Such an implantation site allows us to test the aortic root resistance to high mechanical strains but does not allow evaluation of the aortic leaflet functions.

We observed a limited recolonization associated with weak inflammatory reaction, no visible calcifications, and delayed neointimal proliferation, suggesting that this scaffold could be suitable for in vivo homing. Whether these

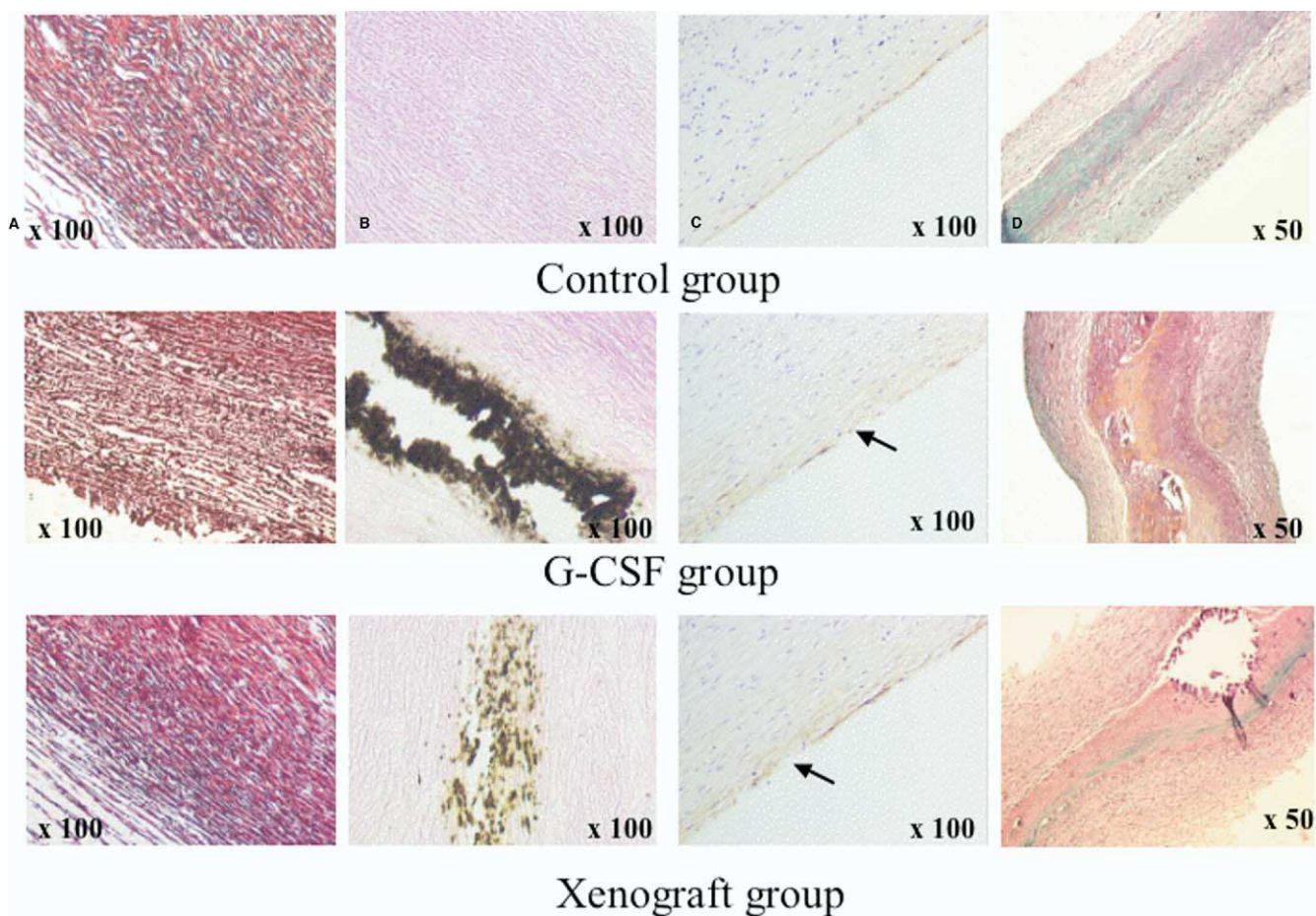


Figure 6. Orcein, von Kossa, and immunochemical staining with anti-VWF antibody in the 3 groups and representative aspects of the leaflets are shown (top row, control group; middle row, G-CSF group; bottom row, xenograft group). **A** (orcein staining), Elastic fibers remained parallel in the control group and were disrupted and disorganized in the xenograft and G-CSF groups. **B** (Von Kossa staining), Evidence of heavy calcifications in the aortic wall in the G-CSF and xenograft groups and not in the control group. **C** (anti-VWF antibody), The luminal surface of the aortic wall was covered by a continuous layer of endothelial cells in the control group and by a disrupted layer (*arrows*) in the G-CSF and xenograft groups. **D** (Masson trichrome staining), Representative aspects of the leaflets in the 3 groups, with calcifications in the G-CSF and xenograft groups.

cells can produce collagen to repair the valve remains to be investigated. Moreover, the media of the aortic wall remained acellular, and although delayed, neointimal proliferation was comparable with that of noncellularized grafts after 16 weeks.

In an attempt to optimize scaffold recolonization, a group of lambs received G-CSF, a growth factor routinely used in human clinical applications, which can mobilize multipotent progenitor cells from BM into peripheral blood. In myocardial infarction beneficial effects of G-CSF, such as decreased left ventricular remodeling and improved myocardial function, have been obtained in animal models.²²⁻²⁴ The advocated mechanisms for these beneficial effects are improvement of the postinfarct

healing process through increased macrophage infiltration, promotion of reparative collagen synthesis in the infarct area, inhibition of apoptosis, and increased neovascularization.²⁵ G-CSF has also been demonstrated to improve endothelialization of vascular grafts in dogs,²⁶ suggesting that it could mobilize early progenitors for endothelial cells. Moreover, it was recently demonstrated that G-CSF mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary disease.²⁷

Because human G-CSF had not been tested previously in lambs, we first verified that it could induce a significant increase in peripheral white blood cell counts in our model. The observed increase was significant, although less pronounced than in human subjects.²⁸ Unfortunately, immuno-

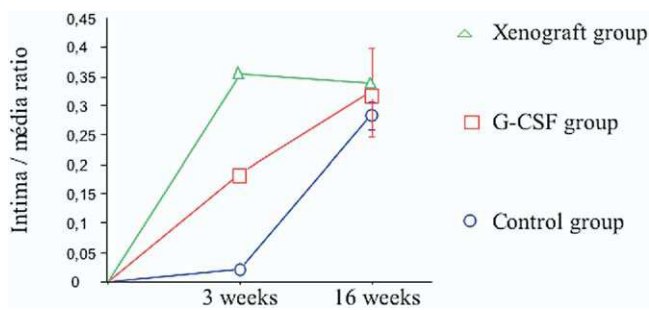


Figure 7. Time course of the intima/media ratio in the 3 groups.

logic identification of stem cells was not possible in this model because available human antibodies against human or mouse stem cell antigens do not react with sheep stem cells. In grafted decellularized heart valves, G-CSF induced an increase in inflammatory cell infiltration and neovessel formation in the adventitia, myointimal proliferation, and calcifications, both in leaflets and the aortic wall, indicating deleterious effects on valve outcome.

Several mechanisms could account for these observations. G-CSF is a physiologic component of the acute-phase response, and its primary effect is the mobilization of neutrophil granulocytes.²⁹ G-CSF-mobilized cells also contain a significantly higher proportion of monocytes than normal peripheral blood and of accessory cells, particularly T-cell subsets. Therefore G-CSF can mobilize various subsets of mature effector cells of the immune and inflammatory response, which could amplify the immune and inflammatory reaction against residual extracellular matrix antigens of the decellularized scaffold. Although the decellularization process we used has been shown to be the most effective on xenoantigen removal,²¹ recent data indicate that porcine scaffolds decellularized with a similar method keep a significant potential to attract monocytes and promote their migration in extracellular matrix.¹⁶ Therefore the deleterious

effects of G-CSF could be related to a dramatic increase of leukocyte-mediated immune and inflammatory reaction against residual xenoantigens, as observed in non-decellularized xenografts. Decellularized allogeneic valves could provide more adequate scaffolds for autologous recellularization, as recently demonstrated.¹⁶ The effects of G-CSF on such allogeneic scaffolds remain to be investigated.

It is noteworthy that the deleterious effects of G-CSF have recently been described in a clinical assay in myocardial infarction in human subjects, in whom G-CSF treatment resulted in increased restenosis rates after coronary stenting.³⁰ We also observed an increased myointimal proliferation in the grafted aortic wall, as well as increased neovessel formation in the adventitia, indicating that G-CSF induces significant and potentially deleterious effects in the aortic wall remodeling process. Although we did not observe any aneurysmal formation, such an early inflammatory reaction could lead to significant weakening of the valve prosthesis and to accelerated valve failure.

The immature sheep model has been used for years for testing bioprosthetic tissue, which degenerates rapidly, as in young patients, with morphology similar to that seen in clinical specimen. Although porcine valve scaffolds decellularized through a nonenzymatic method underwent relatively safe outcome, the extrapolation of data from any animal model to human valve implantation requires caution. Human applications will require additional long-term data because previous results of implantation of tissue-engineered porcine heart valves in pediatric patients have been catastrophic.¹⁸ Further studies will be required.

In conclusion, we demonstrate that xenogenic porcine heart valves decellularized through a nonenzymatic process allow partial spontaneous autologous recolonization, with delayed and limited inflammation and calcifications. However, the recolonization process remains

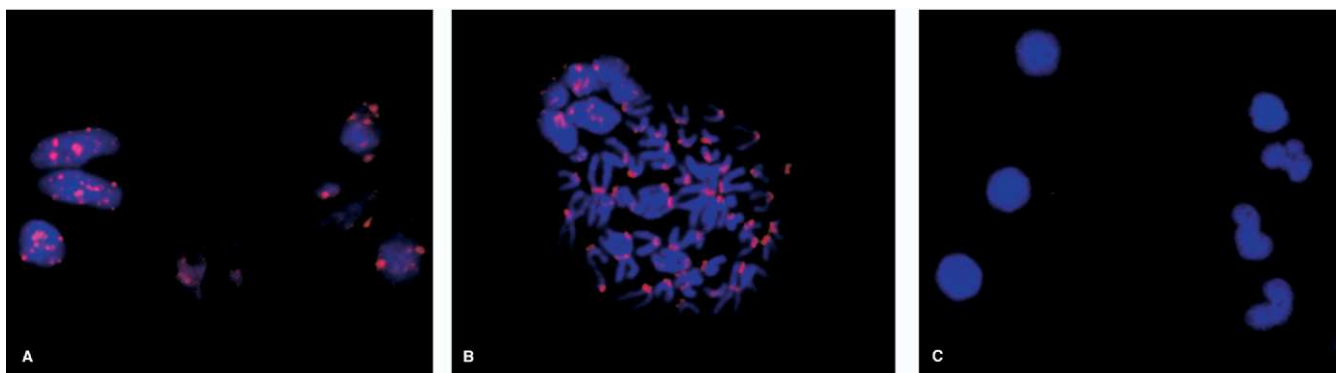


Figure 8. Results of fluorescence in situ hybridization on the cells eluted from the graft (A), a positive control on ovine blood (B), and a negative control on porcine blood (C).

limited, suggesting that further improvement of the extracellular scaffold is mandatory before human implantation. In this setting G-CSF accelerated valve deterioration through increased inflammatory reaction and calcifications. Further studies should consider alternative strategies to improve scaffold recolonization without inducing adverse effects on valve outcome.

We thank François Piumi, Joris Andrieux, Christophe Roumier, and Valérie Soenen for their assistance in developing the ovine molecular probe and Alexandre Eung for expert technical assistance.

References

- Hammermeister KE, Sethi GK, Henderson WG, Oprian C, Kim T, Rahimtoola S. A comparison of outcomes in men 11 years after heart-valve replacement with a mechanical valve or bioprosthesis. Veterans Affairs Cooperative Study on Valvular Heart Disease. *N Engl J Med.* 1993;328:1289-96.
- Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 1995;60(suppl):S513-6.
- Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 2000;102(suppl 3):III44-9.
- Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation.* 2000;102(suppl 3):III50-5.
- Wilcox HE, Korossis SA, Booth C, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Biocompatibility and recellularization potential of an acellular porcine heart valve matrix. *J Heart Valve Dis.* 2005;14:228-37.
- Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, et al. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2000;119:732-40.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature.* 2001;410:701-5.
- Perry TE, Kaushal S, Sutherland FW, Guleserian KJ, Bischoff J, Sacks M, et al. Thoracic Surgery Directors Association Award. Bone marrow as a cell source for tissue engineering heart valves. *Ann Thorac Surg.* 2003;75:761-7.
- Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation.* 2002;106(suppl 1):I143-50.
- Minamino K, Adachi Y, Okigaki M, Ito H, Togawa Y, Fujita K, et al. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), as well as granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), accelerates neovascularization. *Stem Cells.* 2005;23:347-54.
- Kawada H, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, et al. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood.* 2004;104:3581-7.
- 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;11:457-62.
- Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2002;11:463-71.
- Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Meiser B, et al. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:592-601.
- Rieder E, Kasimir MT, Silberhumer G, Seebacher G, Wolner E, Simon P, et al. Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;127:399-405.
- Rieder E, Seebacher G, Kasimir MT, Eichmair E, Winter B, Dekan B, et al. Tissue engineering of heart valves: decellularized porcine and human valve scaffolds differ importantly in residual potential to attract monocytic cells. *Circulation.* 2005;111:2792-7.
- O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;11(suppl 1):194-200.
- Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:1002-6.
- Bechtel JF, Gellissen J, Erasmi AW, Petersen M, Hiob A, Stierle U, et al. Mid-term findings on echocardiography and computed tomography after RVOT-reconstruction: comparison of decellularized (SynerGraft) and conventional allografts. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2005;27:410-5.
- Sayk F, Bos I, Schubert U, Wedel T, Sievers HH. Histopathologic findings in a novel decellularized pulmonary homograft: an autopsy study. *Ann Thorac Surg.* 2005;79:1755-8.
- Goncalves AC, Griffiths LG, Anthony RV, Orton EC. Decellularization of bovine pericardium for tissue-engineering by targeted removal of xenoantigens. *J Heart Valve Dis.* 2005;14:212-7.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10344-9.
- Norol F, Merlet P, Isnard R, Sebillon P, Bonnet N, Cailliot C, et al. Influence of mobilized stem cells on myocardial infarct repair in a nonhuman primate model. *Blood.* 2003;102:4361-8.
- Iwanaga K, Takano H, Ohtsuka M, Hasegawa H, Zou Y, Qin Y, et al. Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;325:1353-9.
- Minatoguchi S, Takemura G, Chen XH, Wang N, Uno Y, Koda M, et al. Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment. *Circulation.* 2004;109:2572-80.
- Bhattacharya V, Shi Q, Ishida A, Sauvage LR, Hammond WP, Wu MH. Administration of granulocyte colony-stimulating factor enhances endothelialization and microvessel formation in small-caliber synthetic vascular grafts. *J Vasc Surg.* 2000;32:116-23.
- Powell TM, Paul JD, Hill JM, Thompson M, Benjamin M, Rodrigo M, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:296-301.
- Anderlini P, Przepiorka D, Champlin R, Korbly M. Biologic and clinical effects of granulocyte colony-stimulating factor in normal individuals. *Blood.* 1996;88:2819-25.
- Noursadeghi M, Pepys MB, Gallimore R, Cohen J. Relationship of granulocyte colony stimulating factor with other acute phase reactants in man. *Clin Exp Immunol.* 2005;140:97-100.
- Kang HJ, Kim HS, Zhang SY, Park KW, Cho HJ, Koo BK, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet.* 2004;363:751-6.

Decellularized heart valve as a scaffold for in vivo recellularization: Deleterious effects of granulocyte colony-stimulating factor

Francis Juthier, André Vincentelli, Julien Gaudric, Delphine Corseaux, Olivier Fouquet, Christine Calet, Thierry Le Tourneau, Valérie Soenen, Christophe Zawadzki, Olivier Fabre, Sophie Susen, Alain Prat and Brigitte Jude

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:843-852

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2005.11.037

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 30 articles, 15 of which you can access for free at: <http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/131/4/843#BIBL>

Citations

This article has been cited by 5 HighWire-hosted articles: <http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/131/4/843#otherarticles>

Subspecialty Collections

This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s):

Cardiac - physiology

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/cardiac_physiology **Molecular biology**

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/molecular_biology **Valve disease**

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/valve_disease

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:

http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.

An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:

http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

When less is more: Go slowly when repopulating a decellularized valve in vivo!

Christof Stamm and Gustav Steinhoff

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;132:735-737

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.04.041

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/132/3/735-a>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2006 American Association for Thoracic Surgery

to treat the ascending aortic and arch pathology in the standard open surgical fashion and follow the progression of the descending thoracic aorta. As Dobrilovic and Elefteriades¹ expertly point out, expansion of the descending thoracic aorta after acute type A dissection may be a slow process. There may, however, be additional reasons to consider simultaneous hybrid repair in this situation.

Total arch replacement involves the use of deep hypothermic circulatory arrest (DHCA). The increased risks associated with this technique have been well documented, and eliminating DHCA for the treatment of acute Type A aortic dissections would potentially make this a safer and better tolerated procedure. Another alternative hybrid approach would be to repair the entry point tear in the ascending aorta with standard open surgical techniques (interposition graft or ascending conduit) and simultaneously bypass the great vessels with grafts off the newly completed ascending aortic graft. Simultaneous deployment of an endoluminal graft in an antegrade fashion through the ascending graft, across the aortic arch, and into the proximal descending thoracic aorta would accomplish a total arch reconstruction without the need for DHCA.³ This approach maximizes the advantages of endovascular technologies by making a complex procedure less invasive while stabilizing the true lumen of the descending thoracic aorta. We have shown that stabilizing the true lumen in the descending thoracic aorta is an active process that in time leads to progressive expansion of the true lumen and continued thrombosis of the false lumen.⁴ In addition to potentially preventing future complications and need for reoperation, stabilization of the true lumen and continued active true lumen expansion after thoracic endografting can potentially improve distal organ perfusion.

Hybrid approaches to complex aortic pathologies may allow us to offer surgical repair to patients with acute type A aortic dissection who might not otherwise tolerate DHCA. The less invasive advantages of simultaneous arch exclusion with an endoluminal graft after great vessel transposition could accelerate patient recovery and provide the added potential advantage of distal true lumen stabilization. I therefore believe that the surgical paradigm may be shifting toward hybrid approaches, not away from them.

Grayson H. Wheatley III, MD
Arizona Heart Institute
Phoenix, Ariz

References

1. Dobrilovic N, Elefteriades JA. Stenting the descending aorta during repair of type A dissection: technology looking for an application? *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131:777-8.
2. Uchida N, Ishihara H, Shibamura H, Kyo Y, Ozawa M. Midterm results of extensive primary repair of the thoracic aorta by means of total arch replacement with open stent graft placement for an acute type A aortic dissection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;131:862-7.
3. Diethrich EB, Ghazoul M, Wheatley GH, Alpern J, Rodriguez-Lopez J, Ramaiah V, et al. Surgical correction of ascending type A thoracic aortic dissection: simultaneous endoluminal exclusion of the arch and distal aorta. *J Endovasc Ther.* 2005;12:660-6.
4. Nathanson DR, Rodriguez-Lopez JA, Ramaiah VG, Williams J, Olsen DM, Wheatley GH, et al. Endoluminal stent-graft stabilization for thoracic aortic dissection. *J Endovasc Ther.* 2005;12:345-9.

doi:10.1016/j.jtcvs.2006.04.043

Reply to the Editor:

We appreciate the thoughtful commentary from Dr Wheatley. We are aware of the imaginative work being done in catheter-based treatment of aortic diseases at the Arizona Heart Institute.

There are certainly many clever ways to “manipulate” the anatomy of the aortic arch to make stent therapy feasible, and we applaud the exploration of these techniques. We disagree, however, with the undercurrent of fear of deep hypothermic circulatory arrest (DHCA) manifest in Dr Wheatley’s letter.

DHCA is a proven modality in aortic surgery, with a vast clinical experience demonstrating its clinical utility and safety.¹⁻⁴ At our own institution, Dr Arjet Gega has just completed (for upcoming submission) a review of 400 patients operated on under “straight” DHCA, without any adjunctive retrograde or antegrade cerebral perfusion. This experience included all comers: ascending, arch, descending, and thoracoabdominal; elective and emergency; and ruptured and nonruptured. Overall mortality was 6.5%, stroke rate was 4.9%, and reexploration for bleeding was 3.9%. Cerebral protection was excellent, with most strokes embolic in origin. The supposed bleeding diathesis of DHCA is simply not a problem. It is not uncommon for us to find the morning’s DHCA patient extubated, vi-

brantly conversant, and having a light supper by the time of evening rounds. DHCA need not be feared. At our institution we marvel at the protective abilities of this technique, and we are pleased to call upon them at every opportunity.

Current results for surgery under DHCA at many expert centers worldwide sets a standard that will be hard to exceed with clever extra-anatomic and catheter based modalities. In fact, it remains to be shown in careful analysis of large clinical series that the alternative modalities can even come close to meeting the excellent results of traditional, direct arch surgery under DHCA.

John A. Elefteriades, MD

Nikola Dobrilovic, MD

Arjet Gega, MD

Department of Cardiothoracic Surgery

Yale University School of Medicine

New Haven, Conn

References

1. Minatoya K, Ogino H, Matsuda H, Sasaki H, Yagihara T, Kitamura S. Surgical management of distal arch aneurysm: another approach with improved results. *Ann Thorac Surg.* 2006;81:1353-7.
2. Appoo JJ, Augoustides JG, Pochettino A, Savino JS, McGarvey ML, Cowie DC, et al. Perioperative outcome in adults undergoing elective deep hypothermic circulatory arrest with retrograde cerebral perfusion in proximal aortic arch repair: evaluation of protocol-based care. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2006;20:3-7.
3. Svensson LG, Nadolny EM, Penney DL, Jacobson J, Kimmel WA, Entrup MH, et al. Prospective randomized neurocognitive and S-100 study of hypothermic circulatory arrest, retrograde brain perfusion, and antegrade brain perfusion for aortic arch operations. *Ann Thorac Surg.* 2001;71:1905-12.
4. Goldstein LJ, Davies RR, Rizzo JA, Davila JJ, Cooperberg MR, Shaw RK, et al. Stroke in surgery of the thoracic aorta: incidence, impact, etiology, and prevention. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2001;122:935-45.

doi:10.1016/j.jtcvs.2006.05.020

When less is more: Go slowly when repopulating a decellularized valve in vivo!

To the Editor:

We read with interest the recent article by Juthier and colleagues¹ describing the effects of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on decellularized xenogenic heart valves implanted in systemic circulation in sheep. The hypothesis was tested

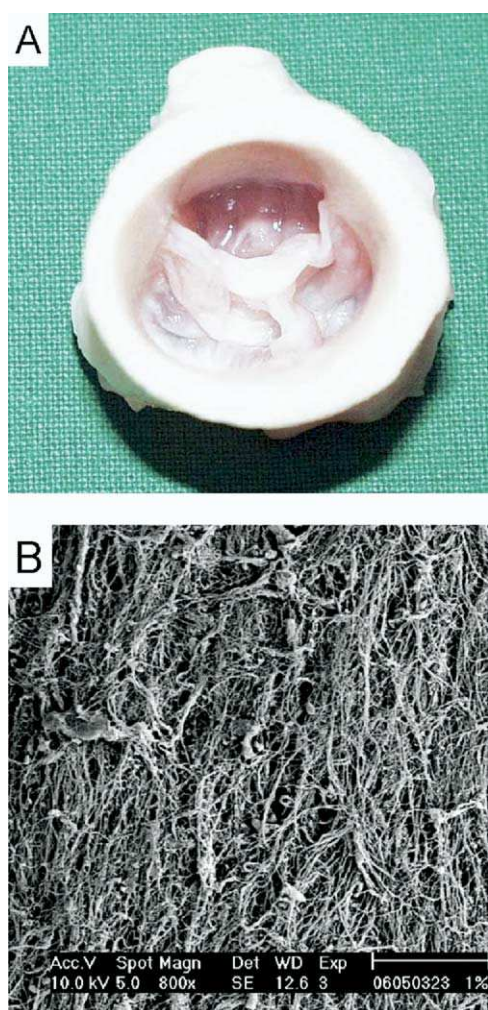


Figure 1. A, Decellularized porcine heart valve impregnated with biodegradable poly-(hydroxy)butyrate to reduce xenoreactivity and improve hemocompatibility and mechanical performance for a limited time. B, Note that polymer impregnation process preserves porosity of decellularized ECM scaffold, so that repopulation with host cells is not disturbed.

that bone marrow cell mobilization by GCSF would facilitate *in vivo* repopulation with endothelial and smooth muscle progenitor cells; however, it was found that the valves actually deteriorated sooner than the same scaffolds in untreated animals. Juthier and colleagues¹ concluded quite appropriately that GCSF accelerated valve deterioration through increased inflammatory reaction, and they suggested searching for alternative strategies to improve scaffold recolonization. Our group has been tackling this very problem in the past, and we believe we have found a promising solution. In 2004, we reported on the biologic

and mechanical properties of biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering.² In essence, porcine aortic valves were enzymatically decellularized and coated or penetrated with a slowly biodegradable polymer with known favorable biocompatibility and hemocompatibility. By doing so, we produced valve scaffold tissue that induces less coagulation and complement activation *in vitro*, displayed favorable behavior in a rabbit aorta *in vivo* model, and, most importantly, gave superior results in terms of endothelialization and clot deposition on implantation in both pulmonary and aortic positions in

sheep. Moreover, polymer impregnation can also help improve the mechanical properties of the valve leaflet, which may be particularly important when enzymatic processes are used for decellularization.³ The polymer impregnation process does not involve glutaraldehyde- or formaldehyde-based fixation steps, so both the biologic and structural properties of the extracellular matrix (ECM) components are left intact, and repopulation with host cells is not hampered (Figure 1). It also masks platelet-activating moieties on ECM components, thereby reducing the risk of collagen-induced platelet aggregation during the early postimplantation phase.

Juthier and colleagues¹ convincingly showed that removal of all xenogenic cells without altering the biologic characteristics of the ECM components reduces the inflammatory response in sheep and improves *in vivo* repopulation with host cells. However, as they themselves pointed out, some immunogenicity of xenogenic ECM inevitably persists.⁴⁻⁶ Even the smallest amount of residual cell detritus can trigger cellular immune response, with macrophage invasion and subsequent blood vessel ingrowth, and the various ECM components possess an inherent immunogenic potential when exposed in a xenogenic setting. We were therefore not surprised to read that massive inflammatory stimulation by GCSF accelerated inflammatory valve matrix infiltration and structural deterioration. After all, the mobilization of (theoretically) beneficial bone marrow stem cells and endothelial progenitor cells by GCSF is secondary to the release of mature leukocytes, and Juthier and colleagues¹ elegantly demonstrated the substantial increase in white blood cell count even in the sheep model. Taken together, we believe that any proinflammatory action should be avoided soon after *in vivo* implantation of decellularized ECM conduits. The rapid failure of Synergrafts in children (with their pronounced inflammatory response to extracorporeal circulation) adds to the evidence.⁷ On the contrary, measures that help reduce the susceptibility of decellularized ECM conduits to cellular and humoral inflammatory are needed. Coating with biodegradable polymer is one such approach, masking proinflammatory components during the early postimplantation phase and thus buying time for vascular host cell re-

population with re-endothelialization and matrix turnover.

Christof Stamm, MD^a

Gustav Steinhoff, MD^b

Dept. of Cardiothoracic and Vascular Surgery
Deutsches Herzzentrum Berlin
Berlin, Germany^a

Dept. of Cardiac Surgery
Universität Rostock
Rostock, Germany^b

References

- 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;131:843-52.
- Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, et al. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:2084-93.
- Grabow N, Schmohl K, Khosravi A, Philipp M, Scharfschwerdt M, Graf B, et al. Mechanical and structural properties of a novel hybrid heart valve scaffold for tissue engineering. *Artif Organs.* 2004;28:971-9.
- Allaire E, Bruneval P, Mandet C, Becquemin JP, Michel JB. The immunogenicity of the extracellular matrix in arterial xenografts. *Surgery.* 1997;122:73-81.
- Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71:343-54.
- Kasimir MT, Rieder E, Seebacher G, Nigisch A, Dekan B, Wolner E, et al. Decellularization does not eliminate thrombogenicity and inflammatory stimulation in tissue-engineered porcine heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006;15:278-86.
- Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:1002-6.
doi:10.1016/j.jtcvs.2006.04.041

Reply to the Editor:

We thank Drs Stamm and Steinhoff for their comments. In the field of tissue-engineered heart valves, the choice between synthetic and biologic (either allogeneic or xenogenic) scaffolds is a major concern. As have many others, we hypothesized that the best valve replacement remains a heart valve. Porcine heart valves have been used for decades in cardiac surgery with good clinical results, especially in terms of durability in elderly patients. In particular, hemodynamic behavior of the latest gener-

ation of porcine bioprostheses, the stentless porcine valves, was found to be similar to that of native aortic valves.

These scaffolds, however, need preimplantation treatment to avoid acute xenogenic rejection. Decellularization seems a promising choice, because it both induces a decrease of cell-induced acute rejection and may allow autologous cell recolonization. Our study suggests that nonenzymatic decellularization may be used without inducing mechanical failure of the matrix in vivo. Previous decellularization procedures, such as deep osmotic shock (with distilled water)¹ or use of trypsin and ribonuclease,² have resulted in graft failure.³ Adverse immune reaction was advocated; however, we observed that a less aggressive decellularization procedure did not induce mechanical failure after 4-month exposure in the systemic arterial strain, suggesting that the decellularization procedure was critical for the in vivo outcome.

Stamm and coworkers⁴ used an enzymatic decellularization procedure, but they reinforced the scaffold with a biodegradable polymer coating. Short-term results were satisfactory, but little is known about the long-term behavior of these polymers. Previous long-term studies on biodegradable scaffolds as heart valve substitutes have reported fibrosis, retraction, and graft dysfunction.⁵

As noted by Stamm and Steinhoff, coagulation and complement activation, with the risk of collagen-induced platelet aggregation early after implantation, are a major concern with decellularized matrices. We found no evidence of thrombus formation on implanted decellularized scaffolds, and thrombosis occurred only in a nondecellularized xenograft. However, it should be underlined that in our study all animals received aspirin therapy (500 mg daily), as in usual clinical practice with biologic valves.

Finally, our study suggests that xenogenic scaffolds decellularized through a nonenzymatic procedure do not induce matrix failure in a sheep model, and interestingly allow partial recellularization in vivo. Longer implantation studies are mandatory to confirm these mechanical results. Moreover, because autologous cell recolonization of these decellularized scaffolds remains only partial, other strategies to induce complete recolonization by proper autologous cells are needed.

André Vincentelli, MD, PhD

Francis Juthier, MD

Brigitte Jude, MD, PhD

Institut National de la Santé et de la
Recherche Médicale (Inserm) ERI-9,
Faculté de Médecine

and

Clinique de Chirurgie Cardio-vasculaire
Cardiologic Hospital
Lille, France

References

- Allaire E, Guettier C, Bruneval P, Plissonnier D, Michel JB. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats. *J Vasc Surg.* 1994;19:446-56.
- O'Brien MF, Goldstein S, Walsh S, Black KS, Elkins R, Clarke D. The SynerGraft valve: a new acellular (nonglutaraldehyde-fixed) tissue heart valve for autologous recellularization first experimental studies before clinical implantation. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1999;11:194-200.
- Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:1002-6.
- Stamm C, Khosravi A, Grabow N, Schmohl K, Treckmann N, Drechsel A, et al. Biomatrix/polymer composite material for heart valve tissue engineering. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:2084-92.
- Vesely I. Heart valve tissue engineering. *Circ Res.* 2005;97:743-55.
doi:10.1016/j.jtcvs.2006.05.017

Lung transplantation in a patient with Mounier-Kuhn syndrome

To the Editor:

We previously reported the first case of successful lung transplantation in a patient with Mounier-Kuhn syndrome.¹ The patient was a 59-year-old woman with a history of bronchiectasis of unknown etiology since childhood. The patient developed very severe obstructive lung disease and multiple episodes of pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa* that necessitated hospitalization. Computed chest tomography and bronchoscopy were diagnostic of Mounier-Kuhn syndrome. The patient underwent bilateral lung transplantation, and the degree of bronchomegaly was not as pronounced as the tracheomegaly and posed little difficulty during transplantation. The patient had a difficult postoperative course, with multiple failed extubations, *P aeruginosa* pneumonia, and prolonged respiratory failure necessitating tracheostomy. The pa-

When less is more: Go slowly when repopulating a decellularized valve in vivo!

Christof Stamm and Gustav Steinhoff
J Thorac Cardiovasc Surg 2006;132:735-737
DOI: 10.1016/j.jtcvs.2006.04.041

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at
http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 7 articles, 3 of which you can access for free at:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/132/3/735-a#BIBL>

Citations

This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/132/3/735-a#otherarticles>

Subspecialty Collections

This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s):
Valve disease
http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/valve_disease

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:
http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.
An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:
http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: Are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates?

Andre Vincentelli, Fabrice Wautot, Francis Juthier, Olivier Fouquet, Delphine Corseaux, Sylvestre Marechaux, Thierry Le Tourneau, Olivier Fabre, Sophie Susen, Eric Van Belle, Frederic Mouquet, Christophe Decoene, Alain Prat and Brigitte Jude

J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134:424-432

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.05.005

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jtcvs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/134/2/424>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2007 American Association for Thoracic Surgery

In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: Are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates?

Andre Vincentelli, MD, PhD,^{a,b,c} Fabrice Wautot, MD,^{a,b,c} Francis Juthier, MD,^{a,b,c} Olivier Fouquet, MD,^{a,b,c} Delphine Corseaux, PhD,^{a,b,c} Sylvestre Marechaux, MD,^{a,b,c} Thierry Le Tourneau, MD, PhD,^{a,b,c} Olivier Fabre, MD,^{a,b,c} Sophie Susen, MD, PhD,^{a,b,c} Eric Van Belle, MD, PhD,^{a,b,c} Frederic Mouquet, MD, PhD,^{a,b,c} Christophe Decoene, MD,^c Alain Prat, MD,^{a,b,c} and Brigitte Jude, MD, PhD^{a,b,c}

Objective: Bone marrow stem cells, especially the mesenchymal stem cell subpopulation, have been used to create in vitro tissue-engineered heart valves. We hypothesized that autologous bone marrow cells, injected in a decellularized porcine scaffold before surgical implantation, could promote in vivo recolonization and limit valve deterioration. We thus analyzed the effects of in situ injection of autologous bone marrow mononuclear cells and of mesenchymal stem cells on the outcome of xenogenic decellularized scaffolds in a lamb model.

Methods: Decellularized porcine pulmonary valves were implanted in the pulmonary artery under cardiopulmonary bypass in 14 lambs after injection in the scaffold of autologous bone marrow mononuclear cells (BMMC) group (n = 7) or of mesenchymal stem cells (MSC) group (n = 7). At 4 months, valve function was evaluated by echocardiography, and valves were explanted for macroscopic and histologic analysis.

Results: Mean transvalvular and distal gradients (millimeters of mercury) were lower in the MSC than those in the BMMC group (1.3 ± 0.39 vs 4.24 ± 0.91 and 4.05 ± 1.89 vs 12.02 ± 6.95 , respectively; $P < .02$). Histologic examination showed significant recolonization and re-endothelialization in both groups. However, significant valve thickening and inflammatory cell infiltration were observed in the BMMC group. By contrast, valves from the MSC group displayed extracellular matrix and cell disposition close to those of native pulmonary valves.

Conclusions: Tissue-engineered heart valves created from mesenchymal stem cells, injected directly in a decellularized xenograft scaffold, exhibited satisfactory hemodynamic and histologic aspects after 4 months. Further long-term studies are needed to demonstrate the potential of mesenchymal stem cells for clinical application in heart valve surgery.

Creating living heart tissue valve prostheses, with structural and functional properties of native valves and without progressive deterioration after implantation in young patients, remains the “grail quest” in the field of heart valve surgery.

Xenogenic bovine pericardial and porcine valves treated with glutaraldehyde have been widely used as valve substitutes and remain the “gold standard” for heart valve surgery. The porcine heart valve is a xenogenic natural scaffold, which has the advantage of adequate anatomic structure and unlimited availability. The glutaraldehyde treatment prevents xenorejection but totally inhibits scaffold recellularization by autologous cells.¹ Decellularization of such scaffolds may be an alternative approach, although potentially resulting in valve weakening.² We have recently demonstrated, in an ovine model, that a xenogenic valve scaffold, decellularized

From Inserm, ERI-9,^a Université de Lille 2, Faculté de Médecine, EA2693,^b Centre Hospitalier Régional Universitaire, and the Departments of Cardiovascular Surgery, Cardiology, and Hematology,^c Lille, France.

Read at the Eighty-sixth Annual Meeting of The American Association for Thoracic Surgery, Philadelphia, Pa, April 29-May 3, 2006.

Received for publication Nov 2, 2006; revisions received April 5, 2007; accepted for publication May 2, 2007.

Address for reprints: Andre Vincentelli, MD, PhD, Clinique de Chirurgie Cardiovasculaire, Hôpital Cardiologique, 59037 Lille cedex, France (E-mail: a-vincentelli@chru-lille.fr).

J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134:424-32
0022-5223/\$32.00

Copyright © 2007 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2007.05.005

Abbreviations and Acronyms

| | |
|------|--|
| DPPV | = decellularized porcine pulmonary valve |
| HBSS | = Hanks balanced salt solution |
| BMMC | = bone marrow mononuclear cell |
| MSC | = mesenchymal stem cell |
| VTI | = velocity time integral |
| VWF | = von Willebrand factor |

through a nonenzymatic process,^{3,4} had a good mechanical resistance under systemic strain. However, the scaffold only allowed partial spontaneous recolonization by host cells after implantation *in vivo*.^{5,6}

Scaffold recolonization by autologous cells before implantation seems a relevant strategy to obtain a fully recolonized living autologous valve. Several groups have demonstrated that *in vitro* seeding of cells on artificial scaffolds or on natural matrices in a biomimetic environment succeeded in the generation of functional tissue-engineered heart valves.⁷⁻⁹ However, this *in vitro* culture step is delicate and requires sophisticated devices and methods.

We hypothesized that this step was not necessary and that direct injection of autologous cells into a decellularized xenogenic scaffold, immediately before surgical implantation, could induce *in vivo* recolonization. In the field of myocardial infarction and cell therapy, cells are usually injected directly into or near the target.¹⁰ To our knowledge, such a possibility has not yet been investigated in the field of tissue-engineered heart valves.

The best cell candidate for such strategy is not known. Cells from various origins, either differentiated vascular structures^{11,12} or more recently newborn cord-derived cells,¹³ have been used for this purpose. Bone marrow seems a more easily available source of autologous multipotent lineage cells. Nonselected bone marrow mononuclear cells (BMMCs) have been successfully used in animal models and in humans to promote revascularization and improve healing after myocardial infarction and limb ischemia.^{14,15} The nonhematopoietic subpopulation of mesenchymal stem cells (MSCs) contains progenitors able to differentiate into valvular cells such as myofibroblasts and endothelial cells.¹⁶ *In vitro* seeding of MSCs on bioabsorbable polymers has already been demonstrated to generate functional heart valves,¹⁷ which were successfully tested *in vivo* in a lamb model.¹⁸ In addition, MSCs have the potential advantage to suppress many immune cell functions and to decrease immune-mediated reactions.^{19,20}

We thus investigated the effects of autologous BMMC or MSC injection in decellularized pulmonary porcine valve scaffolds immediately before implantation in a lamb model.

Materials and Methods**Sampling and Decellularization of Porcine Pulmonary Conduits**

Pulmonary valve conduits were sampled from pigs (Large White/Landrace, 10–15 kg of body weight). The animals were anesthetized by intravenous injection of propofol, 20 mg/kg, and sufentanil, 1 μ g/kg. After median sternotomy, the heart was explanted under surgical conditions. Pulmonary valve conduits were harvested with a thin ridge of subvalvular muscle tissue proximally and a short arterial segment distally. Then porcine valve conduits were calibrated with a Hegar dilatator, weighed, and washed in Hanks balanced salt solution (HBSS) plus aprotinin (10 KIU/mL), penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 μ g/mL), and nystatin (100 U/mL) plus *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N*-2-ethanesulfonic acid (10 mmol/L) at pH 7.6. Valve conduits were decellularized through a nonenzymatic procedure, associating hypotonic shock and low-concentration ionic detergent, as previously described.^{3,4}

In brief, valve conduits were incubated at 20°C during constant stirring in hypotonic buffer (Tris, 10 mmol/L; ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1%; and aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8) for 14 hours and hypotonic buffer with sodium dodecylsulfate (0.1%) for 24 hours, washed in isotonic buffer (Tris, 50 mmol/L; NaCl, 0.15 mol/L; ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1%; aprotinin, 10 KIU/mL; pH 8) 3 times an hour, and then immediately implanted in lambs. In all valves, sterility controls were realized on the last washing solution.

Bone Marrow Sampling and Cell Preparation

Fourteen lambs (Romanov/Ile de France; median age 12 weeks) were operated on in this study. Bone marrow sampling was performed the day before thoracotomy in the BMMC group and 1 week before in the MSC group. General anesthesia was induced and maintained by intravenous injection of propofol, 20 mg/kg, and sufentanil, 1 μ g/kg. Autologous bone marrow aspiration (80 mL) was performed in the iliac crest of the lamb, and cells were seeded in culture medium containing adenine citrate dextrose, RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Inc, Rockville, Md), and heparin. BMMCs were selected through a density gradient (density 1.077 g/mL) and were either stored for 24 hours at room temperature in RPMI 1640 until injection in valve scaffold (BMMC group) or were further cultured to obtain MSCs (MSC group). In brief, mononuclear cells were washed twice with Iscove's modified Dulbecco's medium (1000 g, 10 minutes) and seeded at a density of 1.10⁶ cells/mL in Mesencult medium (StemCell Technologies Inc) supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, and 2 mol/L L-glutamine in 75 cm² T-flasks. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5% carbon dioxide at 37°C. At 80% confluence, cells were washed twice in HBSS buffer and then were detached with 0.25% trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid (Sigma Chemical Co, St Louis, Mo) and resuspended in phosphate-buffered saline solution before injection in the scaffold. From the bone marrow aspirate, 100 \pm 50.10⁶ BMMCs were obtained, which led to a mean amount of 7.7 \pm 3.10⁶ MSCs after 7 days of culture. Viability of the cells (Trypan blue dye exclusion) was greater than 92% in all cases.

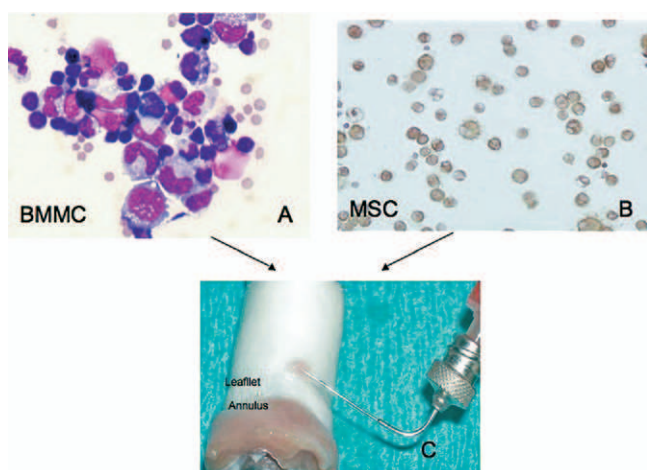


Figure 1. A, Representative examples of bone marrow mononuclear cells (BMMC) after May-Grunwald-Giemsa staining (original magnification $\times 100$). B, Mesenchymal stem cell (MSC) after immunocytochemical analysis with a monoclonal mouse anti-vimentin antibody (original magnification $\times 40$). C, Decellularized porcine pulmonary valve has been reversed on a Hegar dilatator. Injection of the stem cells in the inner side of the pulmonary arterial wall with a customized right-angled 27-gauge needle designed specifically to allow the creation of channels in a blisterlike pattern. The arrows indicate the first injection site. Annulus, pulmonary annulus; Leaflet, free margin of a pulmonary leaflet.

Immediately before surgical valve implantation, all the available cells were injected (2 mL) into each animal via a right-angled 27-gauge needle, as described by Menasche and associates,¹⁰ which allowed the creation of channels in a blisterlike pattern. Cells were injected into the pulmonary arterial wall and into the annulus of pulmonary valve and not into the leaflets (Figure 1). In both groups, 2 animals received BMMCs or MSCs labeled with a fluorescent green marker (PKH67) to track early cell migration in the matrix, at day 1 and day 7 postoperatively.

BMMC and MSC Characterization

Injected BMMCs and MSCs were identified after centrifugation and coloration with May-Grunwald-Giemsa stain and by immunocytochemical analysis with a monoclonal mouse anti-vimentin antibody (1/500, clone V9; DAKO Corporation, Carpinteria, Calif), respectively (Figure 1). In addition, MSCs were characterized through their potential for adipogenic and osteogenic differentiation (Figure 2). In brief, for adipogenic differentiation, MSCs at 80% confluence were washed twice in HBSS buffer and then cultured in Adipogenic Mesencult medium (StemCell Technologies) supplemented with 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. After 2 weeks, adipocytes were stained with oil red O (Sigma). Cells were fixed in a buffered 4% paraformaldehyde solution and incubated with 60% isopropyl alcohol for 5 minutes. Oil red O was added to the cells for 10 minutes. Cells were washed in 60% isopropyl alcohol for 5 minutes and rinsed in

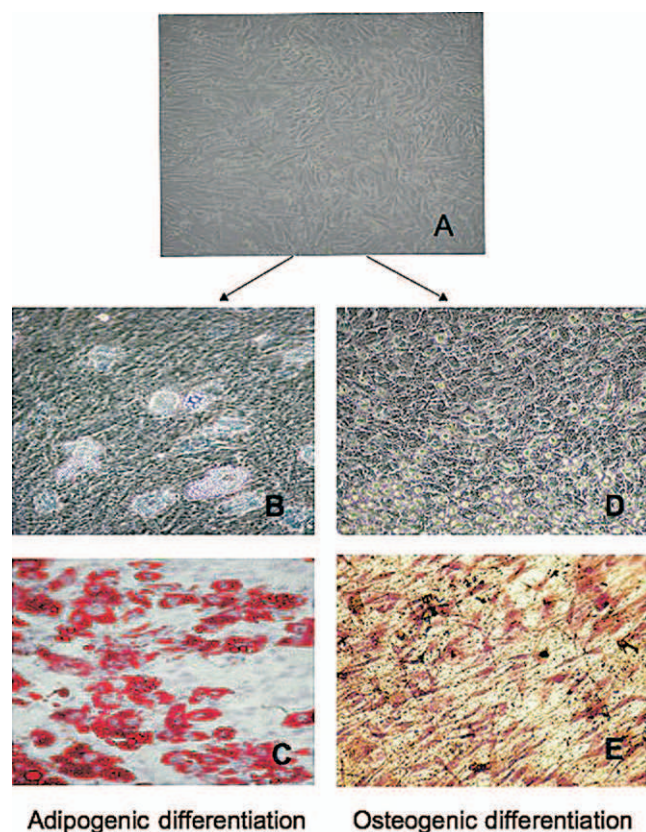


Figure 2. Characterization of ovine MSC (magnification $\times 20$); adipogenic and osteogenic differentiation. A, Ovine MSC after 7-day culture. Left column: B, Adipogenic differentiation; C, intracytoplasmic accumulation of lipid stained with oil red O. Right column: B, Osteogenic differentiation; E, calcium stained with von Kossa method.

distilled water before counterstaining with Gill's hematoxylin (Vector Laboratories, Inc, Burlingame, Calif).

For osteogenic differentiation of MSCs, MSCs at 80% confluence were washed twice in HBSS buffer and then cultured in Osteogenic Mesencult medium (StemCell Technologies) supplemented with 10^{-8} mol/L dexamethasone, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid, 3.5 mmol/L β -glycerophosphate, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. The medium was replaced every 3 days. After 3 weeks, osteogenic cells were stained with silver by the method of von Kossa. Cells were fixed in a buffered 4% paraformaldehyde solution and then stained with 5% silver nitrate (Sigma) for 2 minutes in the darkness and then under a 60-W lamp for 30 minutes. Cells were washed 4 times in distilled water before counterstaining with Gill's hematoxylin.

Study Design and Surgical Procedure

A decellularized porcine pulmonary valve (DPPV) was implanted in the pulmonary trunk of each lamb under cardiopulmonary bypass. Seven animals received a DPPV injected with autologous BMMC and 7 animals a DPPV injected with autologous MSC.

In all animals general anesthesia was induced and maintained as described above. The pulmonary trunk was exposed through a left anterolateral thoracotomy entering through the fourth intercostal space. Two 4–0 purse strings were performed at the level of the aortic arch and around the right appendage. Under complete heparinization, cardiopulmonary bypass (COBE Optimin oxygenator, COBE Cardiovascular, Inc, Arvada, Colo) was established between the right atrium and the aortic arch at normothermia. With the heart beating, the pulmonary trunk was transected, the native pulmonary valve was resected, and the DPPV was inserted with 2 end-to-end 4–0 running sutures. On completion of the operation, heparin was reversed with protamine (200 UI/kg). The chest was closed in layers, and a chest tube was inserted. The chest tube was removed after extubation. Animals were then settled in standard conditions, with food and drink ad libitum. All animals received 1000 mg of ceftriaxone and 500 mg of aspirin for the first postoperative week on a daily basis. For pain control, during the first 2 operative days, a transdermal fentanyl patch was applied on the chest. All the animals received humane care in compliance with the “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” published by the National Institutes of Health.

Echocardiography

Two-dimensional Doppler echocardiography was performed with a Vingmed CFM 800 echocardiograph (General Electric Company, Fairfield, Conn) and a 5-MHz transducer by the same qualified echocardiographer who was blinded to the surgical status of the animals. The parasternal long-axis view was used to measure left ventricular end-systolic and end-diastolic diameter, left ventricular thickness, left ventricular fractional shortening, and left ventricular ejection fraction. The parasternal short-axis view was used to measure the diameter of the right ventricular outflow tract. Velocities time integrals (VTI) were determined at the level of the right ventricular outflow tract and at the level of the prosthesis, respectively, by pulsed and continuous-wave Doppler. Mean and peak transvalvular and transanastomotic gradients (ie, distal gradients) were derived with the modified Bernoulli equation. The Doppler velocity index was determined by the ratio of the VTI across the valve and in the right ventricular outflow tract (RVOT). Effective orifice area was determined by the continuity equation: $(\text{Doppler velocity index} \times \text{RVOT diameter}^2 \times \pi) / 4$. Cardiac output was computed as the product of right ventricular stroke volume (VTI in the RVOT \times RVOT diameter² \times $\pi / 4$) and heart rate. Echocardiographic evaluation was performed at seventh postoperative day and at the time of planned death.

Valve Follow-up and Explantation Process

In each group, 1 lamb was put to death at day 1 and another at day 7 postoperatively for fluorescent cells tracking. The remaining animals were put to death 4 months after implantation. The same protocol of analgesia and anesthetic procedures as for implantation was used to put the animals to death humanely.

Valve Analysis

Explanted valve conduits were grossly examined. Thickness, mobility, and retraction of the cusps and the presence of visible calcifications were reported. Then, fragments from the grafted conduit were sampled for histologic analysis. Samples were fixed

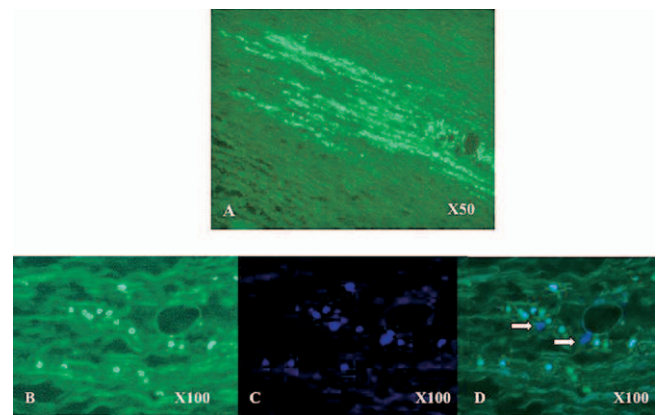


Figure 3. At day 7 after surgical implantation, in both groups, labeled cells were identified in the matrix with PKH67 (green) (A and B) and nuclear counter coloration with 4',6-diamidino-2-phenylindole (blue) (C) and merged (D). Nonfluorescent cells from host origin are visible in the matrix (white arrows).

in a buffered 4% formaldehyde solution, dehydrated, and embedded in paraffin, and sections (6 μm) were stained by Masson's trichrome and von Kossa stains for calcium detection. In addition, samples were fixed in a buffered paraformaldehyde solution, dehydrated, embedded in OCT (methylmetacrylate), and frozen in isopentane at -80°C . Immunostaining was realized on 7- μm frozen sections with monoclonal antibody against α -actin (monoclonal clone ASM-1, Cymbus Biotechnology Ltd [Eastleigh, Southampton, United Kingdom], dilution 1/40 one night at $+4^\circ\text{C}$) or with polyclonal antibody against von Willebrand factor (VWF) (polyclonal clone, Dako, dilution 1/500, 2 hours at room temperature) or with antibody to CD68 (monoclonal clone EBM-11, Dako, 1/50, 1 hour at 37°C), and respective isotope-matched immunoglobulin G control (Cymbus Biotechnology). The immunoreaction was detected with avidin–biotin performed complex peroxidase. The tissue sections were analyzed by 2 independent observers who were blinded for animal group allocation.

Statistical Analysis

Continuous variables were expressed as mean \pm SD and were compared by the Mann–Whitney *U* test and the Wilcoxon test for unpaired and paired data, respectively. Analyses were performed with SPSS 11.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill).

Results

In the 4 animals that had received fluorescent-labeled cells, early explantation showed that at day 1 PKH67-stained cells featured a linear repartition, probably corresponding to the site of needle injection. At day 7, a few cells displaying a scattered disposition were identified in the matrix, in the vascular wall, and in the leaflets. Nuclear counter coloration with 4',6-diamidino-2-phenylindole showed also nonlabeled cells in the matrix, suggesting the presence of cells from host origin (Figure 3).

TABLE 1. Echocardiographic data

| | Postoperative day 7 | | | After 4 months | | |
|---|---------------------|-------------|---------|----------------|-------------|---------|
| | BMMC (n = 5) | MSC (n = 5) | P value | BMMC (n = 5) | MSC (n = 4) | P value |
| Efficient orifice area (cm ²) | 1.4 ± 0.2 | 1.4 ± 0.4 | 1.0 | 1.0 ± 0.2 | 1.4 ± 0.5 | .11 |
| Doppler velocity index | 0.8 ± 0.2 | 0.8 ± 0.2 | 1.0 | 0.5 ± 0.1 | 0.8 ± 0.1 | .032 |
| Mean transvalvular gradient (mm Hg) | 1.5 ± 0.8 | 3.3 ± 3.1 | .42 | 4.2 ± 0.9 | 1.3 ± 0.4 | .016 |
| Mean distal gradient (mm Hg) | 4.4 ± 2.2 | 5.3 ± 2.7 | .55 | 12.0 ± 6.7 | 4.0 ± 1.9 | .032 |
| Maximum transvalvular gradient (mm Hg) | 2.5 ± 1.2 | 4.5 ± 5.0 | .69 | 7.5 ± 1.9 | 2.01 ± 0.8 | .016 |
| Maximum distal gradient (mm Hg) | 6.9 ± 3.0 | 10.6 ± 6.0 | .42 | 20.1 ± 11.7 | 7.5 ± 1.8 | .032 |

BMMC, Bone marrow mononuclear cell; MSC, mesenchymal stem cell.

Early echocardiography (postoperative day 7) showed no valve failure and no significant difference between the 2 groups. The results of early and late (4 months) echocardiography are shown in Table 1. No significant pulmonary regurgitation was recorded in either group at any time. In the BMMC group, we observed a significant increase of the mean transvalvular and distal gradients from day 7 to month 4 ($P = .043$ and $.016$, respectively) (Figure 4). By contrast, the gradients did not increase and even tended to decrease in the MSC group ($P =$ not significant). After 4 months, the mean gradients were significantly lower in the MSC than in the BMMC group ($P = .016$). A decrease of the Doppler velocity index and of the effective orifice area was found in the BMMC group as compared with the MSC group.

Representative gross and histologic features of the 2 groups at 4 months are shown in Figures 5 and 6. In the BMMC group, the wall was thickened with calcifications, with a fibrous pannus covering the suture line; the leaflets were slightly thickened and retracted. In the MSC group, no calcification was observed, the wall remained thin and smooth, suture lines were not covered with fibrous pannus, and leaflets were thin.

In both groups, VWF staining demonstrated complete re-endothelialization, and α -actin staining demonstrated the presence of a thin ridge of smooth muscle cells, which was more pronounced in the MSC group. However, important differences were observed between the 2 groups with respect to other histologic features.

In the adventitia of BMMC group, extracellular matrix was disorganized, with a strong inflammatory cell infiltration, of macrophage origin (anti-CD68 staining), and many neo-vessels were present (Masson trichrome and anti-VWF staining). Numerous cells also infiltrated the media, mostly of macrophage origin (anti-CD68 staining) and collagen fibers were thickened and disorganized, especially in the subendothelial areas. Few cells staining positively for anti- α -actin antibody were present in these areas. The leaflets were thickened, with the disappearance of the differential repartition of collagen between the ventricularis, the spon-

giosa, and the fibrosa. Von Kossa staining showed calcifications in the pulmonary arterial wall.

In the MSC group, the global organization of collagen fibers was preserved, and few fusiform cells were observed in the subendothelial area and in the adventitia. Rare neovessels were visible in the adventitia (Masson trichrome and VWF staining). No inflammatory cells were found after CD68 staining. Pulmonary leaflets exhibited a typical orga-

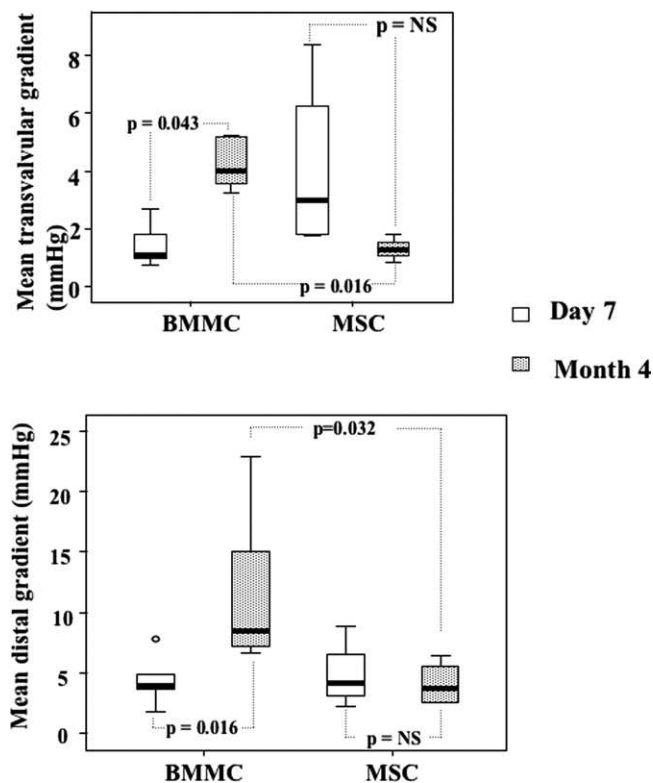


Figure 4. Early and late hemodynamic results. Early gradients were not significantly different between the 2 groups. In the BMMC group we observed a significant increase of the gradient from day 7 and month 4. In the MSC group gradient did not increase and even tended to decrease. Late gradients were significantly lower in the MSC group than in the BMMC group.

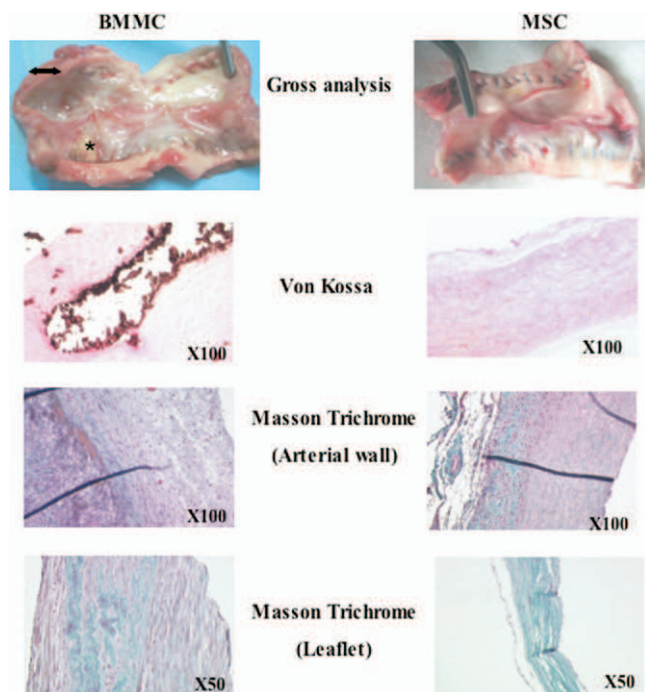


Figure 5. Results 4 months after explantation. *Left column*, BMMC group; *right column*, MSC group. *Top row*, Gross examination showed that the arterial wall was thickened with calcification (*). A fibrous pannus was covering the suture line and the leaflets were thick. In the MSC scaffolds no calcification was observed, the wall remained thin and smooth, leaflets were normal, and suture line were not covered with a fibrous pannus. *Second row*, Von Kossa staining confirmed a huge calcification in the arterial wall of a BMMC group scaffold and none in the SMC group. *Third row*, Masson trichrome stain showed that the fibrillar structure of the arterial wall was better preserved in the MSC group (*right*), adventitia remained thin, and the cell infiltration was restricted to the outer layer, as compared with the BMMC group (*left*). *Fourth row*, The thickness of the leaflets was increased in the BMMC group and remained normal in the MSC group.

nization in 3 layers, fibrosa, spongiosa, and ventricularis, with few recolonizing cells, which were positive for α -actin staining.

Discussion

This study demonstrates that in situ injection of bone marrow cells into a porcine decellularized scaffold before implantation enhanced the in vivo recolonization and induced full re-endothelialization. This original preseeding process allowed scaffold recolonization under physiologic flow conditions, which have been shown to be critical to create functional living valves.²¹ Up to now, this aim was achieved through in vitro incubation in a bioreactor, which mimicks the in vivo pressure–flow conditions and resulted in improved outcome after implantation in lambs.^{21,22} Notewor-

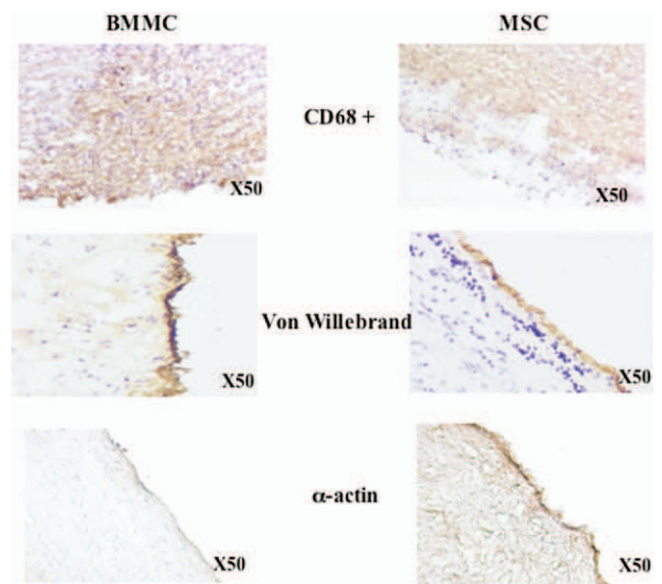


Figure 6. Histochemical analysis. *Top*, CD68+ cell infiltration of the arterial wall in the BMMC group (*left*) and not in the MSC group (*right*). *Middle*, Complete endothelialization in both groups demonstrated by Von Willebrand factor staining. *Bottom*, The presence of a thin ridge of smooth muscle cells after α -smooth muscle actin staining in both groups but mostly in the MSC group.

thy, in situ injection was performed only in the annulus of the valve and in the arterial wall to avoid leaflet injury.

We compared the recolonization potential of two different bone marrow cell populations, BMMCs and MSCs. Short-term echocardiographic results confirmed good hemodynamic performances in both groups, but significant differences were observed after 4 months. The transvalvular and distal gradients significantly increased and the Doppler velocity index significantly decreased in the BMMC group as compared with the MSC group. Moreover, valves from the MSC group exhibited less inflammatory reaction and structural deterioration than those from the BMMC group. BMMC group scaffolds exhibited marked inflammatory reaction with slightly thickened leaflets; some calcifications were found in the arterial wall. The MSC group, scaffolds remained free of degenerative lesions with nonretracted thin leaflets. Interestingly, in this group the suture line was not covered with a thick fibrous pannus. All together, these results suggest the onset of a structural deterioration of the scaffold in the BMMC group and a protective effect of the injection of MSCs.

Several points remain to be investigated with respect to these beneficial effects. We have controlled that injected cells remained in the matrix after implantation after short-term explantation of the conduit (arterial wall and leaflets) at 7 days. Interestingly, host cells were also identified close



to the injected MSCs, underlying the positive chemotactic effect toward migration of autologous cells. However, whether MSCs injected in the scaffold induced in situ differentiation into myofibroblasts and endothelial cells remains uncertain.

MSCs are pluripotent cells present in many tissues, including bone marrow. They can differentiate into osteoblasts, chondrocytes, neurons, skeletal and smooth muscle cells, and endothelial cells.^{16,23,24} The differentiation into myofibroblasts and endothelial cells, as well as collagen synthesis, may depend on mechanical environment, as recently reported.^{25,26} Moreover, MSCs can produce growth factors and cytokines that play a role in their proliferation or differentiation abilities.²⁷

Alternatively, MSCs may induce the homing and differentiation of autologous cells, through a paracrine secretion of growth and chemotactic factors, as previously described.^{21,28–30} MSCs can supply a lot of angiogenic cytokines allowing neovascularization. Part of these beneficial effects may be due to the stem cell factor pathway, which directly increases circulating endothelial progenitors.³⁰ In another model of dilated cardiomyopathy, the healing role of MSCs was directly associated with a decrease of the matrix metalloproteinase activities.³¹

In addition to their healing and angiogenic properties, MSCs induce little rejection by allogenic T cells,³² suggesting that they also have immunomodulatory capabilities^{33,34} as demonstrated in the field of bone marrow graft-versus-host disease.¹⁹ Xenogenic porcine scaffolds remain antigenic, whatever the used decellularization process, and inflammatory and thrombotic process against the implanted scaffold may occur.³⁵

To our knowledge, immunoregulatory properties in the field of xenimmune reactions, as suggested by our results, had not been investigated up to now. However, it is widely demonstrated that immunologic outcome after MSC injection may vary according to environmental factors, and a decrease of immune reaction against residual xenoantigens present in the scaffold seems possible. On the other hand, it should also be underlined that selection of MSCs eliminates a lot of inflammatory cells such as granulocytes, progenitors, and macrophages, as well as lymphocytes, which may enhance the inflammatory and thrombotic reaction when injected in a xenogenic matrix.

Some potential limitations of this study should be underlined. First, in this animal model, we chose a relatively short 4-month observation period. However, the sheep is an accepted model for testing valve prostheses and is known for its fast degeneration of foreign materials after implantation, especially in the growing sheep. Flameng and associates have demonstrated that significant bioprosthetic degeneration could be observed in first 3 months after implantation.³⁶ Thus, the relatively short 4-month period we have chosen

allows relevant observation of the degeneration process. Second, the use of MSCs in tissue valve engineering may also raise concerns with regard to multilineage potential of these cells and possible adverse reactions, such as emergence of tumors in patients receiving such cells. Assessment of the conversion of implanted MSCs to other cell lineages and the survival and fate of implanted cells is warranted before clinical applications. Given these limitations, long-term studies are needed to demonstrate the potential of MSCs for clinical application in heart valve surgery.

In conclusion, we have shown that matrix recellularization was feasible in vivo without a bioreactor. This point will help to simplify clinical applications, because it avoids the complex “pre-seeding step.” Autologous MSCs seem promising cells in this setting, because they improved the mechanical behavior and the healing of a decellularized xenogenic valve. In future clinical applications, bone marrow aspiration followed by selection of autologous MSCs and in situ injection might be realized before valvular replacement. Whether this tissue-engineering approach may be used for clinical studies warrants further long-term animal studies.

This work was realized in Institut Federatif de Recherche 114, and supported by grants from University of Lille 2 (EA2693), from the French Fond National pour la Science, Ministère de la Recherche (Action Concertée Incitative 2002-Grant 02TS 050), and from Conseil Régional Nord Pas de Calais (2003-OBJ2-2004/1-4-1, no. 157) and “ESPRI”/FEDER R04026EE. We especially thank Alexandre Ung for expert technical assistance and Michel Pottier and Arnold Dive for their help in animal care.

References

1. Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, Meiser B, et al. Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003;125:592-601.
2. Simon P, Kasimir MT, Seebacher G, Weigel G, Ullrich R, Salzer-Muhar U, et al. Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT in pediatric patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;23:1002-6; discussion 1006.
3. 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;11:457-62.
4. Korossis SA, Booth C, Wilcox HE, Watterson KG, Kearney JN, Fisher J, et al. Tissue engineering of cardiac valve prostheses II: biomechanical characterization of decellularized porcine aortic heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2002;11:463-71.
5. 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;131:843-52.
6. Fouquet O, Juthier F, Corseaux D, Wautot F, Le Tourneau T, Decoene C, et al. In situ injection of autologous bone marrow stem cells reduces deterioration of decellularized porcine pulmonary valves in a sheep model. *Circulation.* 2005;112(Suppl):III504-5.
7. Shinoka T, Breuer CK, Tanel RE, Zund G, Miura T, Ma PX, et al. Tissue engineering heart valves: valve leaflet replacement study in a lamb model. *Ann Thorac Surg.* 1995;60:S513-6.

8. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits: in vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000;102(Suppl):III50-5.
9. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation*. 2000;102(Suppl):III44-9.
10. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*. 2001;357:279-80.
11. Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, et al. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:732-40.
12. Mol A, Rutten MC, Driessen NJ, Bouten CV, Zund G, Baaijens FP, et al. Autologous human tissue-engineered heart valves: prospects for systemic application. *Circulation*. 2006;114(Suppl):I152-8.
13. Schmidt D, Mol A, Breyman C, Achermann J, Odermatt B, Gossi M, et al. Living autologous heart valves engineered from human prenatally harvested progenitors. *Circulation*. 2006;114(Suppl):I125-31.
14. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, Haberbosch W, Hambrecht R, Holschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2006;355:1210-21.
15. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360:427-35.
16. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Latsinik NV, Panasyuk AF, Keiliss-Borok IV. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17:331-40.
17. Hoerstrup SP, Kadner A, Breyman C, Maurus CF, Guenter CI, Sodian R, et al. Living, autologous pulmonary artery conduits tissue engineered from human umbilical cord cells. *Ann Thorac Surg*. 2002;74:46-52.
18. Sutherland FW, Perry TE, Yu Y, Sherwood MC, Rabkin E, Masuda Y, et al. From stem cells to viable autologous semilunar heart valve. *Circulation*. 2005;111:2783-91.
19. Ringden O, Uzunel M, Rasmussen I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81:1390-7.
20. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*. 2006;36:2566-73.
21. Hoerstrup SP, Kadner A, Melnitchouk S, Trojan A, Eid K, Tracy J, et al. Tissue engineering of functional trileaflet heart valves from human marrow stromal cells. *Circulation*. 2002;106(Suppl):I143-50.
22. Lichtenberg A, Tudorache I, Cebotari S, Suprunov M, Tudorache G, Goerler H, et al. Preclinical testing of tissue-engineered heart valves re-endothelialized under simulated physiological conditions. *Circulation*. 2006;114(Suppl):I559-65.
23. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
24. Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest*. 1999;103:697-705.
25. Kurpinski K, Chu J, Hashi C, Li S. Anisotropic mechanosensing by mesenchymal stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:16095-100.
26. Ku CH, Johnson PH, Batten P, Sarathchandra P, Chambers RC, Taylor PM, et al. Collagen synthesis by mesenchymal stem cells and aortic valve interstitial cells in response to mechanical stretch. *Cardiovasc Res*. 2006;71:548-56.
27. Pittenger MF, Martin BJ. Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ Res*. 2004;95:9-20.
28. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*. 2004;94:678-85.
29. Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, et al. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*. 2005;31:119-26.
30. Fazel S, Chen L, Weisel RD, Angoulvant D, Seneviratne C, Fazel A, et al. Cell transplantation preserves cardiac function after infarction by infarct stabilization: augmentation by stem cell factor. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1310.
31. Fedak PW, Szmitko PE, Weisel RD, Altamentova SM, Nili N, Ohno N, et al. Cell transplantation preserves matrix homeostasis: a novel paracrine mechanism. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130:1430-9.
32. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005;105:1815-22.
33. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res*. 2006;312:2169-79.
34. Bolanos-Meade J, Vogelsang GB. Mesenchymal stem cells and organ transplantation: current status and promising future. *Transplantation*. 2006;81:1388-9.
35. Kasimir MT, Weigel G, Sharma J, Rieder E, Seebacher G, Wolner E, et al. The decellularized porcine heart valve matrix in tissue engineering: platelet adhesion and activation. *Thromb Haemost*. 2005;94:562-7.
36. Flameng W, Meuris B, Yperman J, De Visscher G, Herijers P, Verbeke E. Factors influencing calcification of cardiac bioprostheses in adolescent sheep. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;132:89-98.

Discussion

Dr Richard D. Weisel (Toronto, Ontario, Canada). If you think that the major difference is related to the fact that the cells were cultured, it is possible that they contained some of the cytokines that were used in the culturing process? I presume that you used fetal bovine serum as one of the cytokines. If the cytokines are the important component here, perhaps you need to seed either the cells or the acellular tissue with cytokines in addition to the cells. What are your thoughts?

Dr Vincentelli. We did not investigate this issue about the cytokines precisely, but this remains a possibility. We focused more on the possibility that the selection of cultured MSCs could limit the inflammatory process owing to the scaffold xenoantigens, partly because hematopoietic stem cells were excluded from our population of bone marrow stem cells. But we have not investigated the effects of medium cytokines yet.

Dr Francisco Diniz Affonso da Costa (Curitiba, Brazil). We also have done a lot of experiments in sheep with decellularized allografts from sheep to sheep. What we found is that there is partial re-endothelialization and partial repopulation just with the decellularized allografts. We agree with you that you need to seed some cells, either endothelial cells and fibroblasts or maybe stem cells, as you showed. What do you think is the best method to seed these mesenchymal cells in the valves? Do you just put it there and leave it there or do you have to inject inside the wall or inside the cusps or both? What do you think is the best method to do that?

Dr Vincentelli. Thank you for your comment and your interesting question. We have used the injection in the matrix with a very thin needle, just as used for injection of myoblasts in the myocardium. We found that the same technique could be used for the injection of the cells in the valve matrix. Cells were injected only in the arterial wall, and not in the cusps, which are too thin. Other team used seeding in vitro in a bioreactor. We have hypothesized that we could skip this step and use the animal as a bioreactor. However, we have no direct evidence that the injected cells will directly grow in the matrix. We hypothesize that injected

cells might enhance the autologous recellularization and that injection just before implantation is just a booster for autologous recellularization.

Dr Weisel. The difficulty is that you need to demonstrate that you have an increased survival of the implanted cells by your technique, because you would anticipate that if you had it in a bioreactor for 7 days beforehand, you would have a full difference in the number of cells that were available in the decellularized matrix before implantation. Of course, if you think the biologic activity is related to the function of those cells, they need to be alive, they need to function, they need to produce the cytokines

that are most effective, and that would probably only happen if they had been seeded as opposed to injected immediately before the present implantation. It is a question that will need to be addressed in further studies.

Are there any other questions and do you have any response?

Dr Vincentelli. I agree with your comment. We think that we have still a long way to go. One of the next key points will be the long-term labeling of new cells to evaluate their outcome. This should help to determine whether injected cells engraft, proliferate, and eventually differentiate in situ or send chemotactic and growth signals to other host cells.

In vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve: Are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates?

Andre Vincentelli, Fabrice Wautot, Francis Juthier, Olivier Fouquet, Delphine Corseaux, Sylvestre Marechaux, Thierry Le Tourneau, Olivier Fabre, Sophie Susen, Eric Van Belle, Frederic Mouquet, Christophe Decoene, Alain Prat and Brigitte Jude

J Thorac Cardiovasc Surg 2007;134:424-432

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.05.005

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at
http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 36 articles, 16 of which you can access for free at:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/134/2/424#BIBL>

Citations

This article has been cited by 5 HighWire-hosted articles:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/134/2/424#otherarticles>

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:

http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.

An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:

http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

Tissue-engineered heart valves: Bioreactor yes or no?

Luca Dainese, Fabio Barili and Paolo Biglioli
J Thorac Cardiovasc Surg 2008;135:1189-1190
DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.09.080

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/135/5/1189-a>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2008 American Association for Thoracic Surgery

stent-grafting via a median sternotomy: the frozen elephant trunk procedure. *Ann Thorac Surg.* 2002;74(suppl):S1821-4.
doi:10.1016/j.jtcvs.2007.09.081

Reply to the Editor:

We would like to thank Drs Asano and Okita for their comments regarding our study,¹ in which we demonstrated that the majority of arch aneurysms could be repaired with a long elephant trunk (LET) anastomosed at the base of the innominate artery without distal anastomosis in the descending aorta. They raised the issue of distal fixation of the LET in our technique. Although the proximal end of the LET is sutured at the base of the innominate artery and proximal endoleak is prevented, the distal end of the LET is not fixed, and distal endoleak is possible with our method. As demonstrated in Figure 2, C, in our article, the aneurysmal sac outside the LET was enhanced with contrast material in 9% of our patients, and they required distal fixation of the LET.

However, it is important to note that the majority (91%) of our patients did not show contrast material outside the LET, and none had expansion or rupture of the aneurysm occur during the average follow-up of 33 ± 18 months. Furthermore, it was encouraging for us to find that the nonenhanced aneurysmal sac around the LET shrank more than 5 mm in 82% of the patients and more than 10 mm in 50% at 1 year after total arch replacement with the LET, as shown in Figure 2, B, of our article. The follow-up period might not have been long enough to rule out the possibility of late expansion of a nonenhanced aneurysm, and we consider that long-term follow-up of our patients is mandatory.

In their letter they referred to their article,² in which they insist that arch aneurysms with extension to 1 cm below the level of the carina are accessible from a median sternotomy. Interestingly, they demonstrate that an increased depth of distal anastomosis is a risk factor for prolonged distal anastomosis, even in Japanese patients, whose chest cavities are generally smaller than those in white patients.² Based on my personal experience as a clinical fellow for 3 years in United States, I wonder how many surgeons are comfortable to do the distal anastomosis 1 cm below the level of the carina in a typical barrel-chested white patient. On the other hand, with our technique, the descending aorta in the deep

posterior mediastinum does not need to be exposed, but rather only a distal anastomosis is performed in the distal ascending aorta. Because of this simplicity, we required only 23 ± 8 minutes of hypothermic circulatory arrest in the lower body to complete the insertion and anastomoses of the LET. Thus we conceive that the benefit of our technique might be even more evident in white patients with a large chest.

Koichi Toda, MD

Kazuhiro Taniguchi, MD

Takenori Yokota, MD

Satoshi Kainuma, MD

Department of Cardiovascular Surgery

Osaka Rosai Hospital

Osaka, Japan

References

1. Toda K, Taniguchi K, Hata H, Shudo Y, Matsue H, Kuki S, et al. Single-stage repair of arch aneurysms with a long elephant trunk: medium-term follow-up of thromboexcluded aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007; 134:47-52.
2. Asano M, Okada K, Nakagiri K, Tanaka H, Kawanishi Y, Matsumori M, et al. Total arch replacement for aneurysm of the aortic arch: factors influencing the distal anastomosis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2007;6: 283-7.

doi:10.1016/j.jtcvs.2007.10.076

Tissue-engineered heart valves: Bioreactor—yes or no?

To the Editor:

I read with great interest the article by Vincentelli and associates.¹ In this article the authors present the results of the effects of in situ injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells and mesenchymal stem cells (MSCs) on the outcome of xenogenic decellularized scaffolds in a lamb model. The main focus of this article is on a new method to reseed the cells in valve scaffolds consisting of an in situ injection of bone marrow cells into a porcine decellularized scaffold before implantation. Tissue-engineered heart valves created from MSCs and injected directly in a decellularized xenograft scaffold exhibited satisfactory hemodynamic aspects after 4 months.

Even if the authors demonstrate that in the MSC group the global organization of collagen fibers was preserved, a few fusi-

form cells were observed in the subendothelial area and the adventitia.

Pulmonary leaflets present few recolonizing cells positive for α -actin staining, with a typical organization in 3 layers, fibrosa, spongiosa, and ventricularis, as previously reported by others,² who showed that decellularized pulmonary valves revealed a well-preserved 3-dimensional network of collagen fibers in the extracellular matrix.

As we know, maintenance of the structural valve properties is fundamental to preserve the extracellular matrix with its complex of glycosaminoglycans and collagen fibers produced from valve fibroblasts and active fibroblasts. This appears to be fundamental for the mechanical valve's capability and its long-term durability.²⁻⁴ Repopulation of a decellularized valve is crucial for valve vitality. How this could be achieved still remains controversial. As a matter of fact, at this time, it is not completely clear whether a bioreactor is fundamental for the valve repopulation. Lichtenberg and colleagues⁵ clearly demonstrated that in vitro conditioning of engineered tissues in a bioreactive system stimulates and enhances the production of extracellular matrix and the related tissue strength. On the contrary, Dohmen and associates,⁶ studying seeded or nonseeded decellularized valves implanted into right ventricular juvenile sheep outflow tracts, showed that a difference was identified in the recellularization density of in vitro seeded and nonseeded valves up to 3 months, but no such difference was seen after 6 months.

Nevertheless, a moderate pulsatile flow with small increments seems to be able to stimulate endothelial cell proliferation on the decellularized valve scaffold. A rapid increase in bioreactor flow to physiologic levels leads to significant damage of the reseeded endothelium and complete loss of cusp cellularity. This effect might be responsible for the in vivo failure of static, reseeded, tissue-engineered valves exposed to physiologic hemodynamic forces.

However, whether MSCs injected in the scaffold induced in situ differentiation into myofibroblasts and endothelial cells remains uncertain. The injection of the stem cells in the inner side of the valve before valve implantation must be able to produce a colonization not only by recipient endothelial cells but above all by active

fibroblasts. These should be able to continually remodel the valve matrix and produce its components (eg, glycosaminoglycans) with very high turnover.

On this basis, this work is a great contribution in the complex field of engineered tissue valves, and the announcement is impressive because it should be able to offer a different and easier way to reseed valves before implantation. The authors are congratulated for their current achievements and should be encouraged to validate their results in other in vivo models.

Luca Dainese, MD

Fabio Barili, MD

Paolo Biglioli, MD

Department of Cardiac Surgery

University of Milan

Centro Cardiologico Monzino IRCCS

Milan, Italy

References

1. 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;134:424-32.
2. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation.* 2006;114:1132-7.
3. Dainese L, Barili F, Topkara VK, Cheema FH, Formato M, Aljaber E, et al. Effect of cryopreservation techniques on aortic valve glycosaminoglycans. *Artif Organs.* 2006;30:259-64.
4. Stamm C, Steinhoff G. When less is more: go slowly when repopulating a decellularized valve in vivo!. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132:735-7.
5. Lichtenberg A, Cebotari S, Tudorache I, Sturz G, Winterhalter M, Hilfiker A, et al.

Flow-dependent re-endothelialization of tissue-engineered heart valves. *J Heart Valve Dis.* 2006;15:287-94.

6. Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S, Lopes SV, da Souza FP, Vilani R, et al. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis.* 2006;15:823-9.

doi:10.1016/j.jtcvs.2007.09.080

Reply to the Editor:

We thank Dr Dainese for this comment. Several groups have demonstrated that in vitro seeding of cells on artificial scaffolds or on natural matrices in a biomimetic environment succeeded in the generation of functional tissue-engineered heart valves.^{1,2} More recently, Yacoub³ has said in an interview about mesenchymal stem cells that “if you subject these cells, in a 3 dimensional matrix, to programmes of conditioning using cyclic pressure of a predefined nature, they change their phenotype to one that is very similar to valve tissue.” Yacoub and his team still believe that the future of the tissue-engineered heart valve is dependant of an in vitro seeding in a bioreactor. To our knowledge, for the first time in this field, our work⁴ suggests that direct injection of mesenchymal stem cells seems to induce almost physiologic recolonization of valvular matrix under physiologic shear stress. Re-endothelialization of a decellularized xenogeneic matrix can be obtained in vivo without the cumbersome step of bioreactor recellularization. This has the evident advantage of simplifying the recellularization procedure and guaranteeing that recolonizing cells will stand the actual high shear conditions of a cardiac valve. However, we have to underline the evident limits of our work. First, we do not know

at the present time whether the recolonizing cells directly derive from the injected cells or from autologous cells migrating from blood or neighboring tissue. Second, as suggested by Dainese et al, a longer follow-up period is mandatory and should be prolonged for more than 1 year to confirm our results.

André Vincentelli, MD, PhD^{a,b}

Francis Juthier, MD^{a,b}

Brigitte Jude, MD, PhD^{a,b}

Centre Hospitalier Régional^a

Universitaire de Lille

Pôle de Chirurgie Cardiovasculaire

Institut d'Hématologie Transfusion

Lille, France

Faculté de Médecine^b

Université de Lille

Lille, France

References

1. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, et al. Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* 2000;102:III44-9.
2. Dohmen P, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun J, Pruss A, et al. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg.* 2007;84:729-36.
3. Yacoub M. Viewpoint: heart valve engineering. Interview by James Butcher. *Circulation.* 2007;116:F44-6.
4. 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;134:424-32.

doi:10.1016/j.jtcvs.2007.12.033

Tissue-engineered heart valves: Bioreactor yes or no?

Luca Dainese, Fabio Barili and Paolo Biglioli
J Thorac Cardiovasc Surg 2008;135:1189-1190
DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.09.080

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at
http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 6 articles, 2 of which you can access for free at:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/135/5/1189-a#BIBL>

Citations

This article has been cited by 1 HighWire-hosted articles:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/135/5/1189-a#otherarticles>

Subspecialty Collections

This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s):

Cardiac - other

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/cardiac_other **Transplantation - heart**

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/transplantation_heart **Valve disease**

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/valve_disease

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:

http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.

An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:

http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

Heart valve tissue engineering: Research should proceed along validated routes

Francesca di Marco and Gino Gerosa

J Thorac Cardiovasc Surg 2008;135:1406-1407

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.10.075

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/135/6/1406-a>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2008 American Association for Thoracic Surgery

observed after coarctation repair is not a new phenomenon, but is simply the continuation of the neurosympathetic process that existed before the coarctation repair.

Francis Robicsek, MD, PhD
 Carolinas Heart Institute
 Carolinas Medical Center
 Charlotte, NC 28203

Reference

1. Hager A, Kanz S, Kaemmerer H, Schreiber C, Hess J. Coarctation Long-term Assessment (COALA): significance of arterial hypertension in a cohort of 404 patients up to 27 years after surgical repair of isolated coarctation of the aorta, even in the absence of restenosis and prosthetic material. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134:738-45.
 doi:10.1016/j.jtcvs.2007.11.053

Reply to the Editor:

Robicsek outlined in his letter to the Editor in response to our article¹ that arterial hypertension exists distal the coarctation even before coarctation repair. Hypertension in the long-term follow-up is simply the continuation of this neurosympathetic process.

Previously published data from our group² on blood pressure and aortic distensibility in neonates with coarctation before and after surgical repair did not show poststenotic hypertension before repair in general. However, we totally agree with Robicsek and other authors^{3,4} that inborn processes not touched by current modes of repair are also responsible for hypertension in the long-term follow-up after successful repair. We believe that the starting point of the pathophysiologic chain is the inborn alteration of the arterial wall with elastic fiber fragmentation, fibrosis, and cystic medial necrosis, which are later exaggerated by existing hypertension. This causes the increased stiffness most pronounced in the central elastic arteries, the blunted baroreceptor reflex, and the neurosympathetic activation. However, the novelty of our study was the extent of this phenomenon. Our relation to age showed that arterial hypertension has to be expected in almost all patients after coarctation repair in older ages. Close surveillance and aggressive treatment of arterial hypertension might prevent further cardiovascular disease.

Alfred Hager, MD
 John Hess, MD

Department of Pediatric Cardiology
 and Congenital Heart Disease
 Deutsches Herzzentrum München
 Technische Universität München
 Munich, Germany

References

1. Hager A, Kanz S, Kaemmerer H, Schreiber C, Hess J. Coarctation Long-term Assessment (COALA): Significance of arterial hypertension in a cohort of 404 patients up to 27 years after surgical repair of isolated coarctation of the aorta, even in the absence of restenosis and prosthetic material. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134:738-45.
 2. Vogt M, Kuhn A, Baumgartner D, Baumgartner C, Busch R, Kostolny M, et al. Impaired Elastic Properties of the Ascending Aorta in Newborns Before and Early After Successful Coarctation Repair: Proof of a Systemic Vascular Disease of the Prestenotic Arteries? *Circulation.* 2005;111:3269-73.
 3. Isner JM, Donaldson RF, Fulton D, Bhan I, Payne DD, Cleveland RJ. Cystic medial necrosis in coarctation of the aorta: a potential factor contributing to adverse consequences observed after percutaneous balloon angioplasty of coarctation sites. *Circulation.* 1987;75:689-95.
 4. Niwa K, Perloff JK, Bhuta SM, Laks H, Drinkwater DC, Child JS, et al. Structural abnormalities of great arterial walls in congenital heart disease: light and electron microscopic analyses. *Circulation.* 2001;103:393-400.
 doi:10.1016/j.jtcvs.2008.02.030

Heart valve tissue engineering: Research should proceed along validated routes

To the Editor:

In their article focusing on in vivo autologous recellularization of a tissue-engineered heart valve, Vincentelli and colleagues¹ raise 2 main questions: (1) Which are the best candidates for scaffold repopulation? (2) Does direct injection of cells into the scaffold guarantee adequate cellular recolonization?

According to the cell type chosen for scaffold seeding, the adoption of nonselected bone marrow-derived mononuclear cells was associated with early degeneration with thickening and retraction of the cusps, growth of fibrotic pannus along the suture lines, and thickening and calcification of the wall conduits. Histologically, a marked inflammatory response with extracellular matrix disarray and macrophage infiltration both in the adventitia and the media layers were observed, along with a loss of the proper collagen allocation between the

ventricularis, spongiosa, and fibrosa of the leaflets. Additionally, a significant increase of both transvalvular and distal gradients were recorded at 4-month follow-up echocardiographic analysis. On the contrary, scaffolds repopulated with mesenchymal stem cells did not evidence either degenerative notes or inflammatory reactions.

These findings might suggest “the onset of a structural deterioration of the scaffold in the [bone marrow-derived mononuclear cell] group and a protective effect of the injections of [mesenchymal stem cells].”¹ We are concerned that such conclusions seem audacious because the study suffers from a main limitation represented by the cell-seeding modality. In fact, the authors, looking for an answer to question number 2, choose to inject the cells directly into the decellularized scaffold (onto the conduit walls and valve annulus, excluding the leaflets), instead of adopting a biomimetic environment.

The adoption of this alternative technique, which has been derived from the myocardial setting,² represents an innovative concept for the valvular field and therefore requires a careful validation. Fluorescent cell tracking, which was performed on 4 of 14 animals in the first postoperative week, evidenced, on day 1, the cell persistence onto the injection site and, on day 7, a few scattered cells into the matrix, the arterial wall, and the leaflets. Moreover, nonlabeled cells of host origin were found.

Is this enough to say that “in situ injection of bone marrow cells into a porcine decellularized scaffold before implantation enhanced the in vivo recolonization and induced full re-endothelialization”?¹ First, endothelialization and scaffold repopulation do not coincide. Even bioprostheses undergo an endothelialization process of the inert components once implanted. Second, the process of repopulation implies an architectural and hierarchic cell-specific distribution along the leaflet’s ventricularis, spongiosa, and fibrosa,³ which was not observed in this experience.

In the article’s “Discussion” section, the authors themselves affirm that they had no direct evidence that cells would grow inside the matrix. According to the hypothesis that injected cells might enhance autologous recellularization, further evidence is needed to draw definite conclusions, and the provided results do not concretely support the initial hypothesis.

Francesca di Marco, MD, PhD
Gino Gerosa, MD
Department of Cardiological
Thoracic and Vascular Sciences
Division of Cardiac Surgery
Padua University Medical School
Padua, Italy

References

1. 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;134:424-32.
2. Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet.* 2001;357:279-80.
3. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1274-82.
doi:10.1016/j.jtcvs.2007.10.075

Reply to the Editor:

We thank Drs Di Marco and Gerosa for considering that injection of mesenchymal stem cells (MSCs) in decellularized scaffolds before in vivo implantation represents an innovative concept in the valvular field, and we completely agree that this concept requires a careful validation. However, they expressed some concern about our conclusion that bone marrow-derived mononuclear cell injection induced a structural deterioration of the scaffold and that MSCs induced a protective effect.

We believe that the observation of a deleterious effect of bone marrow-derived mononuclear cells is an interesting point because these cells had never been tested in the field of valve tissue engineering, whereas they are currently used in clinical assays in the field of myocardial failure. Also, we agree that endothelialization and scaffold recolonization are 2 distinct processes that do not always take place together. However, Bertipaglia and colleagues¹ have demonstrated that 2 weeks after in vitro interstitial cell seeding into decellularized leaflets, grafted cells were found penetrating the decellularized scaffold and expressed various immunologic differentiation patterns, such as fibroblasts, myofibroblasts, smooth muscle cells, and

also endothelial cells. Similarly, we observed a significant recolonization after injection of MSCs, and moreover, as stated in our article, pulmonary leaflets exhibited a typical organization in 3 layers (ie, fibrosa, spongiosa, and ventricularis) in each animal of the MSC group.²

Finally, several lines of evidence indicate that in vivo recellularization of valve scaffolds is no longer a “nonvalidated route.” In a previous work we demonstrated evidence of spontaneous recellularization of a decellularized valve.³ Such results were emphasized by Dohmen and coworkers⁴ comparing in vitro seeded and nonseeded valves implanted in sheep. After 6 months, valves from both groups exhibited full recolonization of the leaflets, with comparable hemodynamic behavior and valve remodeling.

We recognize that further studies are needed to compare spontaneous recolonization of an appropriated scaffold and the effects of in situ injection of autologous cells. Also, we have to investigate how injected autologous MSCs improve in situ recolonization by myofibroblasts and endothelial cells or improve host cell migration. However, the challenge seems now to understand and to favor in vivo, rather than in vitro, valve scaffold recolonization.

André Vincentelli, MD, PhD^{a,b}

Francis Juthier, MD^{a,b}

Brigitte Jude, MD, PhD^{a,b}

Centre Hospitalier Régional^a

Universitaire de Lille

Pôle de Chirurgie Cardiovasculaire

Institut d'Hématologie Transfusion

Lille, F-59037 France;

Université de Lille 2^b

EA 2693

Faculté de Médecine

Lille, F-59045 France

References

1. Bertipaglia B, Ortolani F, Petrelli L, Gerosa G, Spina M, Pauletto P, et al. Cell characterization of porcine aortic valve and decellularized leaflets repopulated with aortic valve interstitial cells: the VESALIO Project (Vitalitate Exornatum Succedaneum Aorticum Labore Ingenioso Obtenibitur). *Ann Thorac Surg.* 2003;75:1274-82.
2. 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;134:424-32.
3. 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;131:843-52.

4. Dohmen PM, da Costa F, Yoshi S, Lopes SV, da Souza FP, Vilani R, et al. Histological evaluation of tissue-engineered heart valves implanted in the juvenile sheep model: is there a need for in-vitro seeding? *J Heart Valve Dis.* 2006;15:823-9.

doi:10.1016/j.jtcvs.2007.12.030

Percutaneous aortic valve replacement with the CoreValve bioprosthesis

To the Editor:

We read with interest the recent article by Marcheix and colleagues¹ in the *Journal* dealing with percutaneous aortic valve implantation. They reported their experience using the second generation (21F) of the CoreValve prosthesis (CoreValve, Inc, Paris, France) in 10 consecutive high-risk surgical patients (median logistic EuroSCORE of 32%). The prosthesis was successfully delivered in all cases, with a doubling of the aortic valve area (from 0.57 ± 0.19 to 1.2 ± 0.35 cm²) and a significant decrease in transvalvular gradient.

We would like to comment on these results and also ask for some clarifications regarding their data:

Prosthesis sizing is an important issue. On one hand, undersizing may be responsible for valve migration (owing to poor anchoring), perivalvular leak, or patient-prosthesis mismatch. On the other hand, oversizing may theoretically lead to coronary obstruction or favor atrioventricular block. There is actually only one available size of the CoreValve prosthesis, with a 21-mm bioprosthesis implanted within the stent frame. This valve is at the present time indicated when the aortic annulus diameter ranges from 20 to 27 mm.² Although the authors did not report the annulus size in their group of patients, we do not understand how proper sizing could be achieved with a single-sized bioprosthesis.

Aortic bicuspidy is observed in half of cases of severe aortic stenosis.³ In our experience, misdeployment of a valved stent is likely to occur within a bicuspid aortic valve,^{4,5} which may alter its long-term durability. Did the authors face a case with a bicuspid aortic valve or have they systematically preoperatively screened the patients and excluded for the endovascular procedure those with a bicuspid aortic valve?

Heart valve tissue engineering: Research should proceed along validated routes

Francesca di Marco and Gino Gerosa

J Thorac Cardiovasc Surg 2008;135:1406-1407

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2007.10.075

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at
http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 3 articles, 2 of which you can access for free at:
<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/135/6/1406-a#BIBL>

Subspecialty Collections

This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s):

Valve disease

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/valve_disease

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:

http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.

An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:

http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform

The Journal of
Thoracic and Cardiovascular Surgery

Experimental off-pump transventricular pulmonary valve replacement using a self-expandable valved stent: A new approach for pulmonary incompetence after repaired tetralogy of Fallot?

François Godart, Ivan Bouzguenda, Francis Juthier, Fabrice Wautot, Alain Prat, Christian Rey, Delphine Corseaux, Alexandre Ung, Brigitte Jude and André Vincentelli

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:1141-1145

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2008.07.057

The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

<http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/137/5/1141>

The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery is the official publication of the American Association for Thoracic Surgery and the Western Thoracic Surgical Association. Copyright © 2009 American Association for Thoracic Surgery

Experimental off-pump transventricular pulmonary valve replacement using a self-expandable valved stent: A new approach for pulmonary incompetence after repaired tetralogy of Fallot?

François Godart, MD, PhD,^{a,d} Ivan Bouzguenda, MD,^{a,d} Francis Juthier, MD,^{b,d} Fabrice Wautot, MD,^{b,d} Alain Prat, MD,^{b,d} Christian Rey, MD,^a Delphine Corseaux, PhD,^{c,d} Alexandre Ung,^d Brigitte Jude, MD, PhD,^{c,d} and André Vincentelli, MD, PhD^{b,d}

Objective: Off-pump valve replacement using self-expandable stents is an emerging technique for pulmonary valve disease. However, significant limitations are the lack of easily available valve substitute to be inserted within the stent and, in the setting of repaired tetralogy of Fallot, the existence of huge pulmonary trunk. We report the first experimental results of a transventricular approach using a decellularized porcine xenograft mounted in a self-expandable stent.

Methods: Pulmonary valve replacement was realized in 15 lambs by direct access of the infundibulum through a left thoracotomy, combined with pulmonary artery banding. Animals were followed by transthoracic echocardiography and, after control hemodynamic study, were electively killed either at day 7, month 1, or month 4 after implantation.

Results: Implantation succeeded in all lambs. Two animals died after implantation (1 pneumothorax and 1 endocarditis). Doppler echocardiographic follow-up did not show any significant transvalvular gradient and showed only mild pulmonary regurgitation. The hemodynamic control before termination revealed a systolic pulmonary valve gradient of 18.5 ± 12.4 mm Hg at 1 week ($n = 4$), 13.5 ± 10.6 mm Hg at 1 month ($n = 4$), and 4.3 ± 4.9 mm Hg at 4 months ($n = 5$). Gross examination demonstrated the presence of connective tissue between the valved stent and pulmonary wall, which increased with time.

Conclusion: Fifteen lambs underwent successful deployment of a self-expandable valved stent in the pulmonary position using a transventricular approach. This technique combined with pulmonary artery banding could be a therapeutic option for pulmonary insufficiency after repair of tetralogy of Fallot with a transannular patch.

In patients with congenital heart disease who had surgical pulmonary valvectomy or transannular pulmonary patch, the pulmonary regurgitation can lead to severe right ventricular failure. The classical surgical repair under cardiopulmonary bypass remains the first-line treatment to replace the pulmonary valve but may in fact deteriorate the right ventricular function.¹ More recently, different alternatives have been proposed such as percutaneous implantation or transventricular approach.²⁻⁶ This latter is obviously more invasive for the patient than the transvenous insertion but

allows a pulmonary valve replacement without the need of a cardiopulmonary bypass and is not limited to reduced valve diameter by small catheters or vessel dimensions. Using such an approach, the first implantations in humans were reported by Berdat and Carrel⁵ with a porcine pulmonic valve mounted on a self-expandable stent, and then later by a German team.⁶ The reported results were very promising, but both groups experienced significant drawbacks such as paravalvular leakage and valve migration requiring further surgery. We report here our results of an experimental study of an off-pump pulmonary valve implantation without cardiopulmonary bypass, through a transventricular approach using a decellularized porcine xenograft mounted in a self-expandable stent, and combined with pulmonary artery reduction.

From the Pôle de Cardiologie et Maladies Vasculaires, Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Service des Maladies Cardiovasculaires Infantiles et Congénitales,^a Pôle de Chirurgie Cardiovasculaire,^b Pôle d'Hémo-Transfusion,^c Lille cedex, France; and Université de Lille 2, EA 2693,^d Faculté de Médecine de Lille, Lille cedex, France.

This work was realized in Institut Fédératif de Recherche 114 and was supported by grants from University of Lille 2 (EA2693), from the French Fond National pour la Science, Ministère de la Recherche (Action Concertée Incitative 2002-Grant 02TS 050), from Conseil Régional Nord Pas de Calais (2003-OBJ2-2004/1-4-1, No. 157) and "ESPRI"/FEDER R04026EE, and from the French Society of Cardiology (Hélène de Marsan) and Sesserac.

Received for publication March 30, 2008; revisions received June 9, 2008; accepted for publication July 5, 2008.

Address for reprints: François Godart, MD, PhD, Pôle de Cardiologie et Maladies Vasculaires, Service des Maladies Cardiovasculaires Infantiles et Congénitales, Hôpital Cardiologique, CHRU de Lille, 59037 Lille cedex, France (E-mail: f-godart@chru-lille.fr).

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:1141-5
0022-5223/\$36.00

Copyright © 2009 by The American Association for Thoracic Surgery
doi:10.1016/j.jtcvs.2008.07.057

MATERIAL AND METHODS

All animals received humane care in accordance with the "Principles of Laboratory Animal Care" and the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" (National Institutes of Health publication No. 85-23, revised 1985).

Preparation of the Valve

The selected valve was a decellularized porcine xenograft, prepared in our laboratory as previously described from female piglets (Large White/Landras, 20–25 kg body weight).⁷ The procedure was performed after median sternotomy under surgical conditions. Porcine pulmonic root tissue was obtained from fresh dissection and a blade-cleaning procedure to remove excess connective tissue and myocardium, leaving a thin ridge of

Abbreviation and Acronym

RVOT = right ventricular outflow tract

subvalvular muscle tissue proximally and a short arterial segment distally (Figure 1, A). The porcine valve conduits were then calibrated with a Hegar dilator. The classical preparation using glutaraldehyde was replaced here by techniques of hypotonic nonenzymatic solutions.⁷⁻⁹ This decellularized xenograft has been demonstrated to sustain physiologic shear stress.⁷

Preparation of the Valved Stent and Delivery System

A self-expandable stent made of nitinol, which is a memory-shape alloy (Bard Luminexx; Angiomed GmbH, Karlsruhe, Germany), was employed (30 mm in length and 18 mm in diameter). On the same day of implantation, the porcine valve described above was sewed distally and proximally by running suture in the stent (Figure 1, B). To avoid hammock aspect of the valve, additional sutures were realized in the middle part of the valved stent on 4 cardinal points, and the valve was immersed in saline solution until the implantation (Figure 1, C). The delivery system consisted of a front-loading 22/24-French sheath with outer diameter constant on all its length (Gore Introducer Sheath, Gore and Associates, Flagstaff, Ariz). The inner dilator was distally modified to receive the valved stent within the sheath. It had also a 2-cm conical-shaped tip to allow smooth transition between the tip and the sheath, thus limiting the risk of trauma of ventricle or vessel wall at implantation. The valved stent was loaded by hand-crimping into the previously described delivery system just before release to minimize time of valve compression within the sheath.

Technique of Valve Placement

Valved stents were implanted in lambs (Romanov/Ile de France, 22–34 kg body weight). Animals were placed in right lateral position. In each case, a catheter was placed in the jugular vein to gain access for delivery of medication and a second one in a small artery on the ear to monitor the blood pressure. General anesthesia was induced by means of intravenous injection of propofol ($500 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) and sufentanil ($0.5 \mu\text{g/kg}$ body weight) followed by a continuous venous injection of propofol ($500 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) and sufentanil ($1 \mu\text{g kg}^{-1} \text{h}^{-1}$). Lambs were intubated and mechanically ventilated. Cardiac and respiratory functions were monitored during the entire procedure. Systemic anticoagulation was induced with heparin

(300 UI/kg). All animals received xylocaine (1 mg/kg) to prevent ventricular arrhythmia and were perfused with isotonic saline solution.

A thoracotomy was performed through the fourth left intercostal space. The main pulmonary artery was first dissected free to allow placement of a band around the trunk. The band was tightened to reduce the diameter just below 18 mm and avoid distal embolization of the valved stent in pulmonary vasculature. Then to correctly visualize the pulmonary annulus at implantation, 2 radiopaque markers were placed on the pulmonary artery trunk: the first at the level of the annulus and the second at the distal band. The site of puncture on the right ventricular outflow tract (RVOT) was secured by a purse using a 3-0 polypropylene filament and 2 Teflon felts separated by 15 mm. The right ventricular infundibulum was punctured about 2 cm beneath the pulmonary annulus in the direction of the pulmonary trunk by a 16-gauge needle. A 0.035-inch guide wire was advanced in the lumen of needle and the left pulmonary artery, and the needle was replaced by a 6-French Radifocus Introducer II (Terumo Corporation, Tokyo, Japan). Under fluoroscopic guidance, the initial guide wire was exchanged for a 260-cm-long 0.035-inch Rosen curved guide wire (Cook; William Cook Europe, Bjaeverskov, Denmark) placed in the distal left pulmonary artery. The large introducing sheath with the valved stent was then advanced over that wire and pushed gently with rotational movements to cross the infundibular wall into the RVOT (Figure 2). After correct positioning controlled by fluoroscopic guidance, the valved stent was ejected from the sheath by keeping the inner dilator fixed while the outer sheath was slowly withdrawn, allowing immediate deployment of the valved stent. Bleeding was controlled by tightening of the purse string. Assessment of the valve performance was performed by echocardiography using epicardial scanning with a transducer wrapped in a sterile sleeve. Following the procedure, the ventriculotomy was closed with the suture of the purse and chest in layers by using resorbable sutures. After extubation, animals were settled in standard conditions, with food and drink ad libitum. All animals received 1000 mg of ceftriaxon and 500 mg of aspirin for the first postoperative week on a daily basis. For pain control, a transdermal fentanyl patch was applied for the first 2 days after implantation.

Follow-up Protocol

Animals were evaluated by routine Doppler echocardiographic follow-up after 7 days, 1 month, and 4 months using Vingmed CFM 800 with a 5-MHz probe. Evaluation criteria were: peak systolic gradient across the valved stent and pulmonary valve competence analyzed by color Doppler mapping and graded as mild, moderate, and severe. Euthanasia was performed under the same protocol of analgesia and anesthetic procedures as for implantation. Before death at day 7, 1

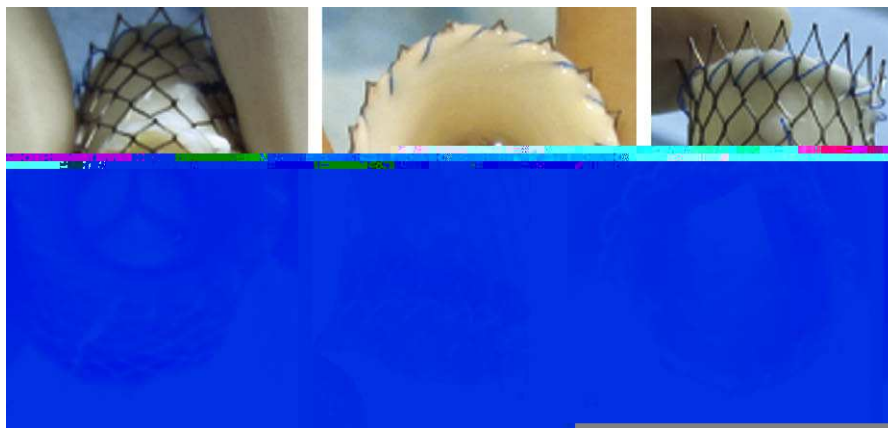


FIGURE 1. Gross appearance of the valved stent. A, Only a thin ridge of subvalvular muscle tissue remains proximally within the stent. B, The porcine xenograft valve is sewed distally and proximally by a running suture on the self-expandable stent. Notice the normal tricuspid aspect of the valve and its competence. C, Additional sutures are realized in the middle part of the valved stent on 4 cardinal points to avoid hammock aspect.

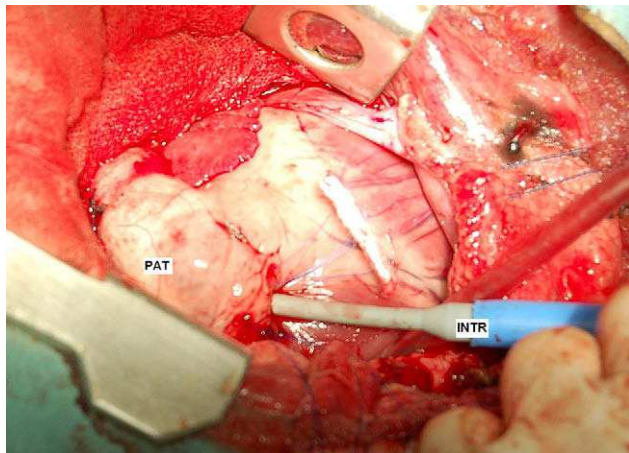


FIGURE 2. The large introducer system with the valved stent is advanced and pushed gently with rotational movements to cross the infundibular wall into the right ventricular outflow tract. It has a 2-cm conical-shaped tip to allow smooth transition between the tip and the sheath to avoid trauma at implantation. PAT, Pulmonary artery trunk; INTR, 22/24 F introducer.

month, or 4 months after implantation, heparin was administered and cardiac catheterization with hemodynamic calculations and angiography was performed to detect valved stent abnormalities and to measure transvalvular gradient.

RESULTS

Valve insertion was attempted in 15 lambs and succeeded in all. The overall procedure times was 100 minutes, but duration from puncture of RVOT, delivery, and valve deployment to infundibular closure was less than 10 minutes. After release, valves were deployed in RVOT in less than 5 seconds. All animals survived the operative procedure. One died the day after from a pneumothorax but postmortem examination revealed a functional pulmonary valve. Another died 3 weeks after implantation from endocarditis leading to severe obstruction of the valved stent.

Functionally, Doppler echocardiography demonstrated good valvular function in the remaining animals without significant regurgitation or stenosis with time. Detailed results

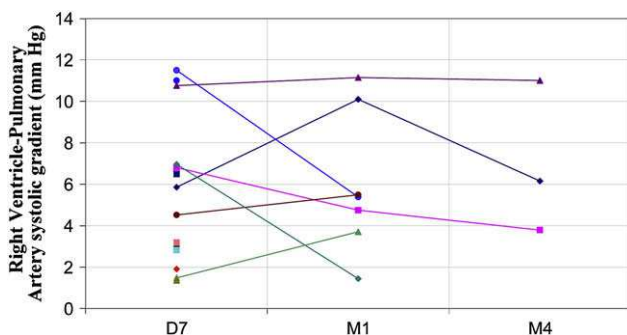


FIGURE 3. Pulmonary transvalvular systolic gradient by Doppler echocardiography at day 7 and 1 and 4 months after implantation. D, Day; M, month.

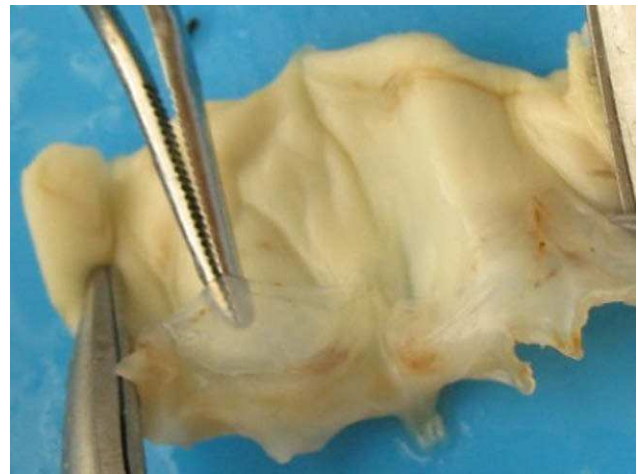


FIGURE 4. Macroscopic examination after fixation in paraformaldehyde solution showing persistent thin aspect of the pulmonary valve leaflet, 4 months after implantation.

of systolic pulmonary valve gradient are reported in Figure 3. Mild pulmonary regurgitation was noticed in 1 lamb at day 7, in 2 lambs at month 1, and in 1 lamb at month 4 after implantation. In addition, 4 lambs exhibited a small paraprothestic leak at the 1 week.

Four animals were sacrificed at day 7, 4 at 1 month, and 5 at 4 months. Control cardiac catheterization performed just before sacrifice displayed a systolic pulmonary valve gradient of 18.5 ± 12.4 mm Hg (range 2.0–29.0 mm Hg) at day 7, 13.5 ± 10.6 mm Hg (range 4.0–25.0 mm Hg) at 1 month, and 4.3 ± 4.9 mm Hg (range 1–10 mm Hg) at 4 months. Following sacrifice, gross anatomic examination demonstrated connective tissue between the valved stent and pulmonary wall, which increased with time: none in the 4 lambs at day 7, proximally in 1 of the 4 lambs at 1 month, and both proximally and distally in all 5 lambs sacrificed at 4 months (Figure 4). Valve morphology was normal with functional competence in all animals but 2. In these 2 animals killed at 4 months, valves exhibited a restrictive mobility due to small leaflet retraction leading to insignificant obstruction or regurgitation (as shown by the echocardiographic study).

DISCUSSION

In congenital heart disease, pulmonary valve replacement is frequently needed. The most frequent reason is pulmonary valve incompetence following repaired tetralogy of Fallot with the transannular patch technique, which is realized in up to 70% of patients. The consequence is a pulmonary regurgitation leading to right ventricular volume overload, dilatation, and possible severe right ventricular dysfunction, leading to significant late morbidity and mortality.¹⁰ In addition, the transannular patch induces frequent dilatation and/or aneurysm of the main pulmonary artery. In this work, we

report an efficient hybrid approach for pulmonary valve replacement. Innovative surgical techniques are usually less invasive and tend to improve patient outcome, length of hospital stay, and perioperative mortality and morbidity.

The most often described innovative approach is the percutaneous pulmonary valve replacement as reported by Bonhoeffer, with the Melody Transcatheter Pulmonary Valve (Medtronic Inc, Minneapolis, Minn).³ However, this technique is actually limited to calcified pulmonary prosthetic conduit not exceeding 22-mm diameter and mainly restricted to adolescents and adults.¹¹ In fact, such procedure is not the answer for patients with repaired tetralogy of Fallot by transannular patch who clearly have a dilated or even aneurysmal pulmonary artery requiring a larger-diameter device.

The transventricular approach clearly has some advantages. First, it decreases distance to the target site and provides the ability to deliver a large introducing system without cardiopulmonary bypass.¹² Second, it is not limited by a possible "size mismatch" between access vessel and delivery system. Third, it allows off-pump pulmonary valve replacement. A transventricular approach was first used by Berdat and Carrel⁵ in 4 children, using a Shelhigh injectable porcine pulmonic valve mounted in a self-expandable stent. This technique, very similar to that reported here, was successful for valve delivery and placement, but 1 child required reoperation 2 months later due to valve migration with severe pulmonary artery obstruction. A similar technique of implantation has been more recently reported with success in 6 patients, but once again, 1 patient with huge RVOT required homograft insertion 2 days later due to significant paravalvular leak.⁶ In our experience, we resolved these limitations by first reducing the diameter of the main pulmonary artery with a band to decrease the risk of valved stent migration in the pulmonary vasculature. Valve embolization could also be anticipated by securing valve position by several additional transmural sutures at the proximal and distal rim of the valved stent during implantation.^{13,14} In fact, the transventricular approach appears to be a real alternative for patients with repaired tetralogy of Fallot and huge pulmonary trunk. This latter, which is limiting factor for transvenous approach, could also in theory be reduced by external lateral plication just before valve replacement. In addition, as available with bovine or porcine xenograft, we anticipate that valves bigger than 22 mm could be inserted without increasing dramatically the size of the whole device, making possible a pulmonary valve replacement by the hybrid technique in humans with no implant size restriction.⁶ Finally, it could probably be performed through a ministernotomy or left anterior lateral thoracotomy.^{11,12,15}

Many valvular substitutes have been employed for valve replacement, including homograft, pulmonary or aortic xenograft with different kinds of preparation, bovine jugular

vein, pericardial valve, tissue-engineered valve, among others.¹⁵⁻¹⁷ Most of them have well-known limitations, including thrombogenicity, susceptibility to infection, and lack of growth potential. If human homograft valve is usually considered as the "gold standard," its availability is very restricted, especially in young patients. Actually, none of the currently used heart valves meet the criteria for an ideal valve replacement, and all have limited durability.¹⁵ These limitations have led us to investigate others strategies of valve preparation and implantation.^{7,9} In this study, we focused on the possibility to adapt a new hybrid approach to a biologic valve substitute with decreased immunogenicity and better biocompatibility. We used a decellularized porcine xenograft prepared in our laboratory by a nonenzymatic decellularization technique as previously described.^{7,8} This valve substitute remained satisfactory at 4-month follow-up after surgical implantation.⁹ In the present study, we did not observe any calcification of this stented decellularized valve. Furthermore, 4 months after implantation, the wall and leaflets remained thin and smooth and no thrombosis was observed (Figure 4). The midterm hemodynamic results were satisfactory with very low transvalvular gradient, as compared with pulmonary homografts. Further studies with long-term observation are needed to appreciate the actual durability of this valve.

The main study limitation is probably the dissection of the pulmonary trunk that will probably be more complex in patients with repaired tetralogy of Fallot because of the post-surgical adhesences, which were not present in this experimental work. This difficulty could possibly be overcome by lateral plication of the main pulmonary trunk combined with transmural sutures to secure valved stent positioning.

In conclusion, we report a hybrid approach using a decellularized porcine valve mounted in a self-expandable stent to replace the pulmonary valve, without cardiopulmonary bypass. This technique was found to be safe and effective, and the new valved stent was able to function up to 4 months in the pulmonary circulation. In addition, the hybrid approach allowed reduction of the main pulmonary artery before implantation, which has a major indication in patients with pulmonary incompetence following repaired tetralogy of Fallot with the transannular pulmonary patch technique. However, no data are yet available on the long-term function of this decellularized valved stent, and further long-term studies are mandatory before considering human applications.

We thank Michel Pottier and Arnold Dive for their help in animal care.

References

1. Therrien J, Provost Y, Merchant N, Williams W, Colman J, Webb G. Optimal timing for pulmonary valve replacement in adults with tetralogy of Fallot repair. *Am J Cardiol.* 2005;95:779-82.
2. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Saliba Z, Merckx J, Aggoun Y, Bonnet D, et al. Percutaneous replacement of pulmonary valve in a right-ventricle to pulmonary-artery prosthetic conduit with valve dysfunction. *Lancet.* 2000;356:1403-5.

3. Bonhoeffer P, Boudjemline Y, Qureshi S, Le Bidois J, Iserin L, Acar P, et al. Percutaneous insertion of the pulmonary valve. *J Am Coll Cardiol*. 2002;39:1664-9.
4. Khambadkone S, Coats L, Taylor A, Boudjemline Y, Derrick G, Tsang V, et al. Percutaneous pulmonary valve implantation in humans. Results in 59 consecutive patients. *Circulation*. 2005;112:1189-97.
5. Berdat PA, Carrel P. Off-pump pulmonary valve replacement with the new Shel-high injectable stented pulmonic valve. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006;131:1192-4.
6. Schreiber C, Hörer J, Vogt M, Fratz S, Kunze M, Galm C, et al. A new treatment option for pulmonary valvar insufficiency: first experiences with implantation of a self-expanding stented valve without the use of cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31:26-30.
7. 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;131:843-52.
8. 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;11:457-62.
9. Vincentelli A, Wautot F, Juthier F, Fouquet O, Corseaux D, Marechaux S, et al. In vivo autologous recellularization of tissue-engineered heart valve: are bone marrow mesenchymal stem cells the best candidates? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;134:424-32.
10. Gatzoulis MA, Balaji S, Webber SA, Siu SC, Hokanson JS, Poile C, et al. Risk factors for arrhythmia and sudden cardiac death late after repair of tetralogy of Fallot a multicentre study. *Lancet*. 2000;356:975-81.
11. Zhou JQ, Corno AF, Huber CH, Tozzi P, von Segesser LK. Self-expandable valved stent of large size: off-bypass implantation in pulmonary position. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;24:212-6.
12. Huber CH, von Segesser LK. Direct access valve replacement (DAVR)—are we entering a new era in cardiac surgery? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2006;29:380-5.
13. Boudjemline Y, Schievano S, Bonnet C, Coats L, Agnoletti G, Khambadkone S, et al. Off-pump replacement of the pulmonary valve in large right ventricular outflow tracts: a hybrid approach. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;129:831-7.
14. Dittrich S, Gloeckler M, Arnold R, Sarai K, Siepe M, Beyersdorf F, et al. Hybrid pulmonary valve implantation: injection of self-expanding tissue valve through the main pulmonary artery. *Ann Thorac Surg*. 2008;85:632-4.
15. Stock UA, Nagashima M, Khalil PN, Nollert GD, Herden T, Sperling JS, et al. Tissue-engineered valved conduits in the pulmonary circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:732-40.
16. Steinhoff G, Stock U, Karim N, Mertsching H, Timke A, Meliss RR, et al. Tissue engineering of pulmonary heart valves on allogenic acellular matrix conduits. In vivo restoration of valve tissue. *Circulation*. 2000;102(suppl 3):III50-5.
17. Dohmen PM, Lembcke A, Holinski S, Kivelitz D, Braun JP, Pruss A, et al. Mid-term clinical results using a tissue-engineered pulmonary valve to reconstruct the right ventricular outflow tract during the Ross procedure. *Ann Thorac Surg*. 2007;84:729-36.

Experimental off-pump transventricular pulmonary valve replacement using a self-expandable valved stent: A new approach for pulmonary incompetence after repaired tetralogy of Fallot?

François Godart, Ivan Bouzguenda, Francis Juthier, Fabrice Wautot, Alain Prat, Christian Rey, Delphine Corseaux, Alexandre Ung, Brigitte Jude and André Vincentelli

J Thorac Cardiovasc Surg 2009;137:1141-1145

DOI: 10.1016/j.jtcvs.2008.07.057

Continuing Medical Education Activities

Subscribers to the Journal can earn continuing medical education credits via the Web at http://cme.ctsnetjournals.org/cgi/hierarchy/ctsnetcme_node;JTCS

Subscription Information

This article cites 17 articles, 12 of which you can access for free at: <http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/content/full/137/5/1141#BIBL>

Subspecialty Collections

This article, along with others on similar topics, appears in the following collection(s):

Congenital - acyanotic

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/congenital_acyanotic **Valve disease**

http://jtcs.ctsnetjournals.org/cgi/collection/valve_disease

Permissions and Licensing

General information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at:

http://www.elsevier.com/wps/find/supportfaq.cws_home/permissionusematerial.

An on-line permission request form, which should be fulfilled within 10 working days of receipt, is available at:

http://www.elsevier.com/wps/find/obtainpermissionform.cws_home/obtainpermissionform