

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 531 838

②① N° d'enregistrement national : **82 14265**

⑤① Int Cl³ : A 01 N 1/02; A 61 F 1/22.

①② **DEMANDE DE BREVET D'INVENTION**

A1

②② Date de dépôt : 18 août 1982.

③③ Priorité

⑦① Demandeur(s) : *CARPENTIER Alain F., CARPENTIER Sophie.* — FR et *NASHEF Aws S.* — US.

⑦② Inventeur(s) : Alain F. Carpentier, Sophie Carpentier et Aws S. Nashef.

④③ Date de la mise à disposition du public de la demande : BOPI « Brevets » n° 8 du 24 février 1984.

⑥③ Références à d'autres documents nationaux apparentés :

Demande divisionnaire bénéficiant de la date de dépôt du 23 mars 1982 de la demande de brevet initiale n° 82 04892 (art. 14 de la loi du 2 janvier 1968 modifiée).

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : Marc-Roger Hirsch.

⑤④ Autre tissu biologique greffable et procédé pour sa préparation.

⑤⑦ L'invention concerne un tissu biologique greffable et un procédé pour sa préparation; pour préparer en particulier des valvules cardiaques bioprothétiques qui sont sujettes à se calcifier après la greffe, on traite le tissu avant la greffe avec des solutions efficaces pour réduire la calcification du tissu greffé.

FR 2 531 838 - A1

D

AUTRE TISSU BIOLOGIQUE GREFFABLE ET PROCEDE
POUR SA PREPARATION

La présente invention concerne un tissu biologique greffable et un procédé pour sa préparation.

5 La conservation par le glutaraldéhyde des tissus biologiques, en particulier des valvules cardiaques bioprothétiques porcines, a permis de: a) éviter les mauvaises performances des tissus valvulaires greffés conservés par le formaldéhyde; b) cesser de réaliser des homogreffes valvulaires; et c) éviter l'emploi indésirable des antioagulants nécessaires pour empê-
10 cher une thromboembolie associée à l'emploi des valvules cardiaques non bioprothétiques (mécaniques) en particulier chez l'enfant. Cependant comme c'est le cas d'autres découvertes importantes semblables, il semble que les bioprothèses conservées par le glutaraldéhyde posent des problèmes qui leur sont propres.

15 Bien que les valvules de Carpentier et autres conservées par le glutaraldéhyde, qui sont relativement inertes du point de vue biologique, présentent une excellente longévité dans la plupart des cas, leur emploi continu présente des inconvénients graves, tels qu'une fatigue tissulaire et une tendance à la calcification. De plus on considèrerait au départ que
20 les enfants et les adolescents seraient les sujets tirant le plus grand profit des valvules cardiaques bioprothétiques conservées par le glutaraldéhyde, grâce à la suppression des anticoagulants que nécessitent les prothèses mécaniques. Les résultats d'un nombre croissant d'études cliniques récentes montrent qu'une calcification grave de ces tissus s'accompagnant
25 d'une défaillance relativement rapide, s'observe chez les enfants et les adolescents. Donc, malgré leur longévité prolongée et la fréquence globale réduite des complications, ces valvules conservées par le glutaraldéhyde sont considérées par certains comme inappropriées à l'emploi chez l'enfant.

La calcification tissulaire demeure en grande partie mystérieuse;
30 cependant on a précédemment montré que divers facteurs, tels que les

anomalies du métabolisme du calcium, l'âge, l'alimentation, la dégénérescence de composants tissulaires tels que le collagène et les turbulences, interviennent tous dans une certaine mesure. Récemment, l'existence d'un amino-acide spécifique fixant le calcium, qui s'accumule après l'implanta-
5 tion des xénogreffes porcines conservées par le glutaraldéhyde, a été établie et on a pensé qu'il jouait un rôle dans la calcification. Bien que la calcification s'accompagne de dégradations des fibres de collagène du tissu greffé traité par le glutaraldéhyde, on ne sait pas si la calcifica-
10 tion dystrophique est la cause ou le résultat de la dégénérescence tissulaire. Néanmoins, on a poursuivi les efforts pour élucider la source du problème de la calcification des tissus greffés en espérant y porter rapidement remède. A ce jour ni la source ni la cause de la calcification des greffons biologiques ni des mesures appropriées pour éviter ou réduire la calcification des greffons biologiques n'ont été établies.

15 Selon l'invention on a déterminé une cause sous-jacente de la calcification des greffons biologiques et en particulier des bioprothèses valvulaires conservées par le glutaraldéhyde. De plus on a simultanément mis au point des procédés permettant de réduire ou d'atténuer de façon efficace la calcification des tissus biologiques greffés.

20 Une des causes sous-jacentes de la calcification des bioprothèses valvulaires, notée pour la première fois dans les études immédiates des demandeurs, est la présence de phosphate en contact avec les tissus avant la greffe en des quantités qui entretiennent la calcification après la greffe. Les teneurs en phosphate normalement observées dans les milieux
25 d'expédition, tels que les solutions salées équilibrées (solution de Hanks, etc.), le plasma, et le tampon salé phosphaté 0,01 à 0,10 M (PBS), utilisés classiquement dans les solutions de fixation à base de glutaraldéhyde, entretiennent tous à des degrés divers la calcification des tissus. A ce jour, les effets nuisibles du phosphate en contact avec les greffons
30 biologiques, n'ont pas été appréciés et par conséquent les chercheurs, les cliniciens et les fabricants ignorent les conséquences indésirables que provoque le traitement de ces greffons par des solutions phosphatées; en particulier du fait que des solutions phosphatées, telles que la solution de Hanks, le PBS et le glutaraldéhyde-PBS, ont été couramment utilisées et
35 sont très recommandées. On comprend donc pourquoi on ait parfois recommandé, au lieu du tampon PBS, d'utiliser pour le stockage des tissus des tampons bicarbonate (ayant des capacités tampons et des gammes de pH semblables), l'emploi dans ce cas d'un milieu ne contenant pas de phosphate ne résultant

pas d'une intention délibérée. De plus, dans certains cas, même les milieux de conservation des tissus tamponnés au bicarbonate ont des teneurs élevées en phosphate. Comme les conséquences fâcheuses du maintien des greffons tissulaires en contact avec un phosphate n'étaient pas connues, les cliniciens ou les fabricants des bioprothèses ne cherchaient pas délibérément à éviter le contact des tissus avec des solutions de phosphate.

L'invention concerne des procédés qui réduisent de façon efficace la calcification des tissus biologiques greffés. Ces procédés réduisent de façon avantageuse la tendance à la calcification des bioprothèses et résolvent certains des problèmes associés à la longévité des xénogreffes de valvules cardiaques.

L'invention concerne un procédé amélioré pour traiter un tissu biologique avant la greffe qui atténue ou réduit la calcification après la greffe.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend la mise en contact du tissu avec une quantité d'un cation divalent s'opposant par compétition à la fixation du calcium, efficace pour réduire la calcification du tissu après la greffe, et le maintien du tissu en contact avec ledit cation.

L'invention va maintenant être décrite de façon détaillée.

L'invention a pour objet de rendre résistants à la calcification divers types de tissus biologiques greffables provenant de nombreuses sources animales et de nombreuses régions de l'organisme. Ainsi le tissu peut provenir entre autres de bovins, de porcins, de chevaux ou de lapins; et il peut être constitué de tendons, de ligaments, de valvules cardiaques ou de tissus utilisés pour réaliser des valvules cardiaques, tels que la duremère et le péricarde. Egalement l'invention peut s'appliquer à un tissu utilisé pour réaliser des greffes en plaques, p. ex. des plaques cutanées, des plaques péricardiques des plaques aortiques et des tympons. Selon l'invention on n'a pas observé de différence significative de la vitesse de calcification entre le péricarde de porc et les tissus des valvules aortique, tricuspide et mitrale de porc.

Bien que l'on se soit principalement intéressé aux préparations tissulaires qui sont fixées ou tannées, telles que les valvules cardiaques traitées au glutaraldéhyde, les tissus conservés non fixés bénéficient de l'invention. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, des valvules cardiaques ou du tissu péricardique de porc fixés dans le glutaraldéhyde et traités puis implantés sous la peau de rats et de lapins ont bénéficié d'une atténuation ou réduction prolongée inattendue de la calcification après l'implantation. Cette atténuation prolongée de la calcification constitue un procédé d'accroissement de la longévité du tissu greffé, en particulier des valvules cardiaques bioprothétiques.

Selon un mode de réalisation de l'invention, un tissu biologique traité avec des cations divalents, avant la greffe et maintenu en contact avec lesdits ions, présente une réduction ou une atténuation avantageuse de la calcification après la greffe.

- 5 Les ions divalents ajoutés au tissu semblent entrer en compétition de façon efficace vis-à-vis des sites de fixation du calcium du tissu, en particulier après la greffe, lorsque dans certains cas des sites additionnels de fixation du calcium sont formés. L'accroissement de la quantité des ions divalents tels les ions magnésium dans le tissu après fixation dans du glutaraldéhyde-PBS, provoque une
- 10 réduction ou une atténuation prolongée de la calcification, tandis qu'un tissu fixé dans du glutaraldéhyde-PBS avec des quantités accrues de cation divalent puis exposé à des quantités additionnelles de phosphate entretenant la calcification, ne présente pas de diminution ou d'atténuation de la calcification. Donc selon l'invention il n'est pas nécessaire de maintenir le tissu traité par le
- 15 cation divalent en contact avec une solution hypophosphatée avant ou pendant le traitement par l'ion, cependant on préfère maintenir le tissu dans une solution hypophosphatée après le traitement par l'ion divalent avant la greffe.

Selon la présente invention, il est apparu que tout ion divalent qui entre en compétition de façon efficace vis-à-vis des sites de fixation du calcium dans

20 le tissu réduit la calcification. Par conséquent les cations divalents employés de préférence sont les ions Ba, Mg, Sr, Cu, Zn, Ag et Hg. On a constaté conformément à l'invention qu'un tissu traité par des ions Ba, Mg et Sr préalablement à l'implantation réduisent de façon efficace la calcification. L'ion Mg est employé de préférence dans le cadre de l'invention.

- 25 Dans un mode de réalisation préféré de l'invention, les ions magnésium proviennent de solutions de sel de magnésium; on préfère particulièrement des solutions de sel soluble dans l'eau tel que le chlorure de magnésium ($MgCl_2$), le sulfate de magnésium ($MgSO_4$) et le carbonate de magnésium ($MgCO_3$). Dans le mode de réalisation que l'on préfère particulièrement, le sel de magnésium
- 30 contient des ions magnésium en une quantité efficace pour réduire ou atténuer la calcification du tissu après la greffe. Bien que la concentration des ions magnésium et le moment de leur mise en contact avec le tissu puissent varier, il est préférable que le tissu soit pratiquement saturé de solutions contenant des quantités efficaces de cet ion.

- 35 Selon l'invention, on considère que les quantités efficaces de cations divalents tels que les ions magnésium en contact avec le tissu sont des quantités supérieures aux quantités observées dans certains PBS, les solutions salées équilibrées et le plasma. Les solutions classiques de PBS ont généralement une teneur en ions magnésium de l'ordre de 0,001% en poids, les solutions salées équilibrées

une teneur de l'ordre de 0,002% en poids et la limite supérieure dans la plasma est de l'ordre d'environ 0,003% en poids. La quantité préférée d'ions magnésium est supérieure à environ 0,003 à environ 0,004% en poids. La quantité maximale d'ions magnésium considérée comme utile dans l'invention est celle nécessaire à l'obtention d'une solution isotonique. La saturation du tissu avec des solutions contenant environ 0,03% d'ions magnésium réduit de façon efficace la calcification du tissu et constitue un procédé préféré. Pour effectuer cette saturation, on plonge le tissu dans une solution de chlorure de magnésium à 0,26% poids qui constitue une solution à 0,03% en poids d'ions magnésium. Des solutions consistant en des solutions salines équilibrées contenant plus d'environ 0,003 d'ions magnésium normalement présents dans le plasma conduisent à un effet bénéfique et sont employées de préférence.

Selon un mode de réalisation de l'invention, un tissu valvulaire porcin prélevé, expédié dans une solution salée tamponnée à l'HEPES, fixé dans une solution salée tamponnée à l'HEPES contenant 0,25% en poids de chlorure de magnésium et 0,625% en poids de glutaraldéhyde, rincé dans une solution salée tamponnée à l'HEPES contenant 0,26% en poids de chlorure de magnésium, stérilisé dans une solution salée tamponnée à l'HEPES contenant 0,26% en poids de chlorure de magnésium et environ 4,0% en poids de formaldéhyde, rincé et conservé dans une solution salée tamponnée à l'HEPES contenant 0,26% en poids de chlorure de magnésium et 0,625% en poids de glutaraldéhyde, jusqu'à un moment précédant immédiatement la greffe, présente de façon avantageuse une atténuation ou une réduction importante de la calcification après la greffe. Donc selon un mode de réalisation de l'invention on préfère particulièrement fixer le tissu biologique par le glutaraldéhyde dans une solution salée tamponnée à l'HEPES contenant une quantité efficace de magnésium et maintenir la solution en contact avec ladite solution salée tamponnée à l'HEPES et les ions magnésium jusqu'à un moment précédant immédiatement la greffe.

Egalement selon l'invention, le tissu biologique traité en l'absence de quantités efficaces de cations divalents tel que Mg peut être rincé dans des solutions stériles, telles que des solutions de chlorure de magnésium, immédiatement avant la greffe pour réduire la calcification ultérieure.

Les tampons utilisés selon un mode de réalisation de l'invention sont de préférence stables, inertes vis-à-vis du processus de stabilisation et ont un pouvoir tampon suffisant pour maintenir un pH acceptable en particulier pendant la fixation des tissus. Le choix du tampon approprié et de sa

concentration dépend des conditions particulières de préparation des
tissus auxquelles plusieurs fabricants ont apporté des variantes. Les tampons
préférés selon l'invention comprennent les tampons borate, carbonate, bicar-
bonate, cacodylate (non toxiques chez l'animal) et d'autres tampons synthé-
5 tiques artificiels ou organiques tels que l'HEPES (acide N-2-hydroxyéthylpi-
pérazine-N'-2-éthanesulfonique), le MOPS (acide morpholinepropanesulfonique)
et le PIPES (acide 1,4-pipérazinediéthanesulfonique). Les tissus préparés
dans le tampon HEPES présentent de façon avantageuse une diminution
importante de la calcification après la greffe et on préfère donc particu-
10 lièrement ce tampon dans l'invention.

De préférence, les solutions tamponnées ou non tamponnées utilisées
selon l'invention doivent être inertes vis-à-vis du processus de stabilisa-
tion des tissus que provoquent des agents fixateurs tels que le glutaraldé-
hyde. Ils ne doivent donc pas réagir avec l'agent fixateur ni empêcher l'a-
15 gent fixateur de réaliser la fixation appropriée des tissus.

On sait que des tampons contenant des amines primaires et
secondaires, tels que le tris(hydroxyméthyl)aminométhane (TRIS), réagissent
avec les groupes aldéhydes du glutaraldéhyde et gênent ainsi le processus normal
de stabilisation des tissus. Des tampons, tels que le TRIS, bien qu'ils soient
20 pratiquement dépourvus de phosphate, nuisent à la stabilisation des tissus
après la greffe et doivent donc être évités.

D'autres buts et avantages de la présente invention apparaîtront
à la lecture de la description suivante, donnée à titre non limitatif, à
la lumière des exemples illustrant des modes de réalisation particuliers,
25 mais en aucune façon susceptibles de constituer une quelconque limitation
de la portée de l'invention.

EXEMPLE 1

On rince à fond un tissu de valvule aortique porcine prélevé, on
l'expédie, on le fixe avec du glutaraldéhyde à 0,625% en poids, on le stéri-
30 lise dans du formaldéhyde à environ 4%, on le conserve entre environ 4 et
25°C, le tout en présence d'une solution isotonique (285 ± 15 millimoles)
hypophosphatée contenant 0,885% en poids de chlorure de sodium à pH 7,3, on

rince dans une solution salée pour éliminer le glutaraldéhyde résiduel immédiatement avant l'implantation et on implante à des lapins en cours de croissance. On récupère le tissu valvulaire à des intervalles réguliers d'une semaine pendant une durée totale de 6 semaines. Après récupération, on évalue l'importance de la calcification tissulaire par détermination quantitative du pourcentage pondéral de calcium dans le tissu sec par analyse par absorption atomique, et on l'évalue du point de vue histologique par observation du degré de calcification de coupes de tissu colorées selon la méthode de Von Kossa. De façon simultanée et identique, on évalue l'importance de la calcification d'un tissu de valvule cardiaque que l'on a rincé, expédié, fixé avec du glutaraldéhyde à 0,625% en poids, stérilisé dans du formaldéhyde à environ 4%, conservé entre environ 4 et 25°C, le tout en présence d'une solution isotonique 0,02 M en phosphate et à 0,885% en poids de chlorure de sodium à pH 7,3 (PBS 0,02 M), rincé dans une solution salée pour éliminer le glutaraldéhyde résiduel immédiatement avant l'implantation et implanté à des lapins en cours de croissance.

Les résultats histologiques et quantitatifs indiquent que le tissu valvulaire implanté traité avec la solution hypophosphatée présente une diminution nette de la calcification par rapport au tissu valvulaire traité avec du PBS 0,02 M.

EXEMPLE II

On effectue des expériences identiques à celles de l'exemple I, si ce n'est que l'on implante le tissu à des lapins adultes et qu'on le récupère à des intervalles réguliers de un mois pendant une durée totale de six mois. De façon semblable, les résultats de l'examen histologique et du dosage quantitatif montrent que le tissu valvulaire implanté traité avec la solution hypophosphatée présente une diminution importante de la calcification par rapport au tissu valvulaire traité avec du PBS 0,02 M.

EXEMPLE III

On effectue des expériences semblables à celles de l'exemple II, si ce n'est que la solution hypophosphatée contient de plus 0,54 g/l du sel de sodium de l'HEPES lors du rinçage et de l'expédition et 5,83 g/l du sel de sodium de l'HEPES pendant la fixation, la conservation et la stérilisation. Dans ce cas également, les résultats de l'examen histologique et du dosage quantitatif indiquent que le tissu valvulaire implanté traité avec la solution hypophosphatée présente une calcification réduite par rapport au tissu valvulaire traité avec le PBS 0,02 M.

EXEMPLE IV

On effectue des expériences semblables à celles de l'exemple I, si ce n'est que les solutions hypophosphatées contiennent de plus 0,54 g/l du sel de sodium de l'HEPES pendant le rinçage et l'expédition, 5,39 g/l du sel de sodium de l'HEPES pendant la fixation, le stockage et la stérilisation et 2,6 g/l de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ pendant la fixation, la conservation et la stérilisation. Dans ce cas également les résultats de l'examen histologique et des dosages quantitatifs montrent que le tissu valvulaire implanté traité avec la solution hypophosphatée présente une diminution nette de la calcification par rapport au tissu valvulaire traité avec le PBS 0,02 M.

EXEMPLE V

On effectue des expériences identiques à celles de l'exemple IV, si ce n'est que l'on plante le tissu à des lapins adultes et qu'on le récupère à des intervalles réguliers de un mois pendant une durée totale de 6 mois. Les résultats de l'examen histologique et du dosage quantitatif montrent que les tissus valvulaires implantés traités avec la solution hypophosphatée, présentent une diminution nette et prolongée de la calcification par rapport aux tissus valvulaires traités avec du PBS 0,02 M.

EXEMPLE VI

On effectue des expériences semblables à celles de l'exemple I, si ce n'est que la solution hypophosphatée contient de plus du tampon cacodylate à la concentration de 0,5 M et que l'on récupère le tissu valvulaire uniquement après une et deux semaines. De plus on évalue simultanément et de façon identique l'importance de la calcification observée lorsqu'avant la greffe on utilise une solution 0,012 M en phosphate et à 0,885% en poids de chlorure de sodium à pH 7,5 (PBS 0,012 M). Les résultats histologiques montrent que le tissu valvulaire implanté traité avec une solution hypophosphatée présente une légère diminution de la calcification après une semaine par rapport au tissu valvulaire traité avec le PBS 0,012 M. Ensuite on observe une calcification modérée.

EXEMPLE VII

On effectue des expériences identiques à celles de l'exemple VI, si ce n'est que l'on remplace le cacodylate par du tampon borate 0,1 M. Les résultats histologiques sont semblables à ceux de l'exemple 6.

EXEMPLE VIII

On effectue des expériences identiques à celles de l'exemple VII, si ce n'est qu'aucune des solutions comparatives n'est hypophosphatée, les solutions utilisées pour la fixation, la conservation et la stérilisation
 5 étant constituées de PBS 0,02 M au lieu de tampon HEPES. Les résultats de l'examen histologique et du dosage quantitatif montrent que le tissu valvulaire implanté traité avec la solution de chlorure de magnésium phosphatée présente une réduction de la calcification par rapport au tissu valvulaire traité sans chlorure de magnésium.

10

EXEMPLE IX

On effectue des expériences semblables à celles de l'exemple III, pour évaluer l'intégrité du tissu après l'implantation. Les résultats des analyses indiquent qu'il n'y a pas de différence significative de la température de rétraction, des valeurs de la réaction à la ninhydrine, de la
 15 teneur en acide uronique lixiviable dans le produit de lixiviation acide des mucopolysaccharides, de la stabilité du tissu soumis à une digestion par la pronase, de la coloration histologique, de l'analyse des amino-acides, de l'ultrastructure évaluée par microscopie électronique par transmission et de la teneur en humidité.

20

EXEMPLES X à XXII

On traite du tissu valvulaire cardiaque porcin prélevé, avec des solutions hypophosphatées ou des solutions contenant du phosphate à divers stades du traitement (avant fixation, pendant la fixation avec le glutaraldéhyde et après la fixation) avant l'implantation à des rats pour évaluer
 25 le degré d'atténuation de la calcification obtenu pour chaque stade du traitement. Les résultats du tableau suivant résument les observations faites pendant une période atteignant dans certains cas deux mois après l'implantation. Dans le tableau, G_p indique le tissu traité par le glutaraldéhyde dans du PBS 0,02 M; F_{H_2O} indique le tissu traité par du formaldéhyde aqueux; G_{eau} indique le tissu traité par le glutaraldéhyde aqueux; F_p
 30 indique le tissu traité par le formaldéhyde dans du PBS 0,02 M; G_{HEPES} indique le tissu traité par le glutaraldéhyde dans de l'HEPES 0,002 M; $G_{carbonate}$ indique le tissu traité par le glutaraldéhyde dans du tampon carbonate; solution salée/HEPES désigne la solution salée tamponnée par
 35 l'HEPES à 0,002 M et BSS indique une solution salée équilibrée.

ETUDE DE LA CALCIFICATION CHEZ LE RAT

5	Avant fixation	Traitement de fixation	Après fixation	Degré de calcification
	PBS	G _p	phosphatée	important
10	PBS	F _{H₂O}	hypophosphatée	réduit (degenerescence)
	PBS	F _p	phosphatée	important (degenerescence)
15	PBS	G _{water}	hypophosphatée	réduit
	PBS	G _{HEPES}	hypophosphatée	réduit
	PBS	G _{carbonate}	hypophosphatée	legèrement réduit
20	HANKS (BSS)	G _p	phosphatée	important
	Solution salée HEPES	G _p	phosphatée	important
25	HANKS (BSS)	G solution salée/HEPES	hypophosphatée	réduit
	PBS Solution salée	G solution salée/HEPES	hypophosphatée	réduit
	Solution salée	G solution salée/HEPES	hypophosphatée	réduit (prolongé)
30	PBS	G _p	MgCl ₂ hypophosphatée	réduit (prolongé)
	PBS	G _p	MgCl ₂ -G _p	important

EXEMPLE XXIII

Des essais identiques à ceux de l'exemple IV sont mis en oeuvre si ce n'est que l'on remplace $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ par $\text{BaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à une concentration de 2.2g/l. Les résultats obtenus montrent que Ba a un effet
5 sur la calcification similaire à celui du Mg

EXEMPLE XXIV

Des essais identiques à ceux de l'exemple IV sont mis en oeuvre si ce n'est que l'on remplace $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ par $\text{SrCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ à une concentration de 2,3g/l. Les résultats obtenus montrent que Sr a un effet
10 sur la calcification similaire à celui du Mg.

Bien entendu, l'invention n'est pas limitée aux modes de réalisation décrits et représentés et elle est susceptible de nombreuses variantes, accessibles à l'homme de l'art, sans que l'on ne s'écarte de l'esprit de l'invention.

REVENDEICATIONS

1. Procédé pour traiter un tissu biologique avant la greffe, caractérisé en ce qu'il comprend les stades de:
 - a) mise en contact du tissu avec une quantité d'un cation divalent entrant en compétition vis-à-vis des sites de fixation du calcium, efficace pour réduire la calcification du tissu après la greffe; et
 - b) maintien du tissu en contact avec ledit cation.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le cation divalent est un ion magnésium ou un de ses sels.
3. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le sel de magnésium est choisi parmi $MgCl_2$, $MgSO_4$, et $MgCO_3$.
4. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que le sel de magnésium est le chlorure de magnésium.
5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1, 2 ou 4, caractérisé en ce que le tissu est traité avec une quantité de cation divalent suffisante pour le saturer.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le tissu biologique est utilisé pour la préparation d'une valvule cardiaque.
7. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que le tissu est utilisé pour la préparation d'une valvule cardiaque et la concentration du chlorure de magnésium est d'environ 0,26% en poids.
8. Procédé pour accroître la longévité d'un tissu biologique greffable, caractérisé en ce qu'il comprend les stades de :
 - a) accroissement de la quantité des cations divalents entrant en compétition vis-à-vis des sites de fixation du calcium à une valeur efficace pour réduire la calcification du tissu après la greffe ; et
 - b) maintien du tissu en contact avec ledit cation.
9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que le cation divalent est l'ion magnésium ou l'un de ses sels.
10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le sel de magnésium est choisi parmi $MgCl_2$, $MgSO_4$ et $MgCO_3$.
11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que le sel de magnésium est le chlorure de magnésium.
12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8, 9 ou 11, caractérisé en ce que le tissu est traité avec une quantité de cation divalent suffisante pour le saturer.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 8, 9 ou 11, caractérisé en ce que le tissu biologique est utilisé pour la préparation d'une valvule cardiaque.

5 14. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que le tissu est utilisé pour la préparation d'une valvule cardiaque et la concentration du chlorure de magnésium est d'environ 0,26 % en poids.

15. Bioprothèse stable ayant une tendance réduite à la calcification, caractérisée en ce qu'on l'a traitée avant la greffe avec une solution efficace pour réduire la calcification.

10 16. Bioprothèse selon la revendication 15, caractérisée en ce que le tissu est traité avec une quantité d'un cation divalent efficace pour réduire la calcification du tissu après la greffe.

17. Bioprothèse selon l'une quelconque des revendications 15 ou 16, caractérisée en ce qu'on l'utilise pour des valvules cardiaques.

15 18. Bioprothèse selon l'une des revendications 15 ou 16, caractérisée en ce que le cation divalent est un ion magnésium ou un de ses sels.