

**UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTE
UFR DE MEDECINE**

THESE

**POUR L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR D'UNIVERSITE
DISCIPLINE : RECHERCHE CLINIQUE, INNOVATION TECHNOLOGIQUE, SANTE PUBLIQUE
SPECIALITE : CHIRURGIE VASCULAIRE**

**PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE :
21 DECEMBRE 2012**

PAR :

BLANDINE MAUREL

**RESTENOSE INTRA-STENT :
EVALUATION DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES *IN VIVO*
ET ELABORATION D'UN MODELE *EX VIVO* HEMODYNAMIQUE**

**PROF. STEPHAN HAULON
DR. FENG CHAI**

**DIRECTEUR
CO-DIRECTRICE**

**PROF. ERIC ALLAIRE
PROF. YANN GOUEFFIC**

**RAPPORTEUR
RAPPORTEUR**

**PROF. MICHEL AUPART
DR. MAURICE PETITOU**

**EXAMINATEUR
EXAMINATEUR**

REMERCIEMENTS

AUX MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur Stephan Haulon

Mon directeur de thèse, qui m'a accueilli à bras ouvert dans son équipe, tant sur le plan chirurgical que scientifique, qui a poursuivi la direction de mes travaux, et qui m'a beaucoup soutenue. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Yann Goueffic

Toi qui fais autorité dans le domaine de la resténose et de l'athérosclérose, tu m'as beaucoup aidé à mes débuts en partageant ton savoir avec un grand dévouement et je t'en remercie sincèrement. Je te suis très reconnaissante d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Eric Allaire

Vous qui êtes une référence absolue pour tous les chirurgiens chercheurs, vous avez su me transmettre une passion pour la recherche durant votre enseignement en master II. Soyez assuré que je mesure l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Monsieur le Professeur Michel Aupart

Chirurgien cardiaque de talent et meneur d'équipe aux qualités exceptionnelles, j'ai énormément appris à vos côtés et vous remercie sincèrement pour le soutien que vous me témoignez. Je vous suis très reconnaissante de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

Madame le Docteur Feng Chai

Ingénieur de Recherche au laboratoire et co-directrice de ma thèse, je te remercie d'avoir accepté de codiriger ces travaux avec beaucoup de rigueur et de dévouement. Merci pour ton aide et ta disponibilité.

Monsieur le Docteur Maurice Petitou

Directeur de la Recherche et du Développement chez Endotis Pharma, et référent dans le domaine des molécules antithrombotiques, je vous remercie d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

JE TIENS EGALEMENT A REMERCIER :

Le Professeur Patrick Lermusiaux

Qui m'a inspiré ce travail, en a dirigé les débuts, et m'a transmis son enthousiasme pour la recherche.

Les membres du laboratoire U1008 :

Mickael Maton

Pour ton aide précieuse, ton implication et ton sens de l'humour, travailler avec toi est très agréable.

Le Docteur Nicolas Blanchemain

Responsable de l'équipe, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire et permis de poursuivre mes travaux de thèse à vos côtés.

Le Professeur Jürgen Siepmann

Directeur de notre laboratoire, pour ses enseignements. L'ensemble de l'équipe et tout particulièrement Myriem Gargouri pour ses conseils.

Le Professeur Christophe Sarraf et le Professeur Farid Bakir

Ingénieurs du Laboratoire de Dynamique des Fluides de l'Ecole Nationale Supérieure des Arts et Métiers à Paris, avec qui nous avons développé une collaboration fructueuse et très enrichissante sur ce projet.

Mes collègues chirurgiens vasculaires du CHU de Lille, **Richard Azzaoui, Jonathan Sobocinski et Matthieu Guillou**, pour leur support et l'entre aide sympathique que nous avons pu établir entre nous.

Mes parents, pour leurs encouragements,

Et Enguerrand, pour son soutien inconditionnel.

Et enfin, **l'Institut de l'Athérombose** et la **Société de Chirurgie Vasculaire** de langue française, qui par leurs dotations de recherche nous ont permis de réaliser ces travaux, ainsi que l'industrie pharmaceutique **CORDIS** qui nous a fourni gracieusement l'ensemble des stents utilisés dans ce travail.

NOMENCLATURE

NO : Oxyde Nitric

eNOS : Nitric Oxide Synthase endothéliale

ROS : Reactive Oxygen Species

ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule-I

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1

AHA : American Heart Association

CAMs : Cell Adhesion Molecules

LDL : Low Density Lipoprotein

IL : Interleukine

TGF : Transforming Growth Factor

TNF : Tumeur Necrosis Factor

IFN : Interferon

MMPs : Matrix Metalloproteinases

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

TGF : Transforming Growth Factor

IGF : Insuline-like Growth Factor

CEPS : Comité Economique des Produits de Santé

GP : Glycoprotéine

RANTES : Normal T Cell Expressed and Secreted

CRP : C Réactive Protéine

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

EGF : Epidermal Growth Factor

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

Akt : protéine kinase B

ras : système rénine-angiotensine

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

IRS-I : Insulin Receptor Substrate-I

SHP2 : Src Homology Protein 2

mTOR : mammalian Target of Rapamycin

cdks : cyclin-dependent kinases

cdkI : cyclin-dependent kinases Inhibitors

Rb : protéine Rétinoblastique

cdc2 : cell division 2 kinase

FDA : Food and Drug Administration

PEVAC : polyethylene-co-vinyl

PBMA : Poly n-butyl methacrylate

HO : Hème Oxygénase

NO : Nitric Oxyde

cGMP : Cyclic Guanine Monophosphate

MIP-1 β : Macrophage Inflammatory Protein-1 β

SDF-1 : Stromal Cell-derived Factor 1

PAF : Paraformaldéhyde

n/m : aire de la néointima / aire de la média

MET : Microscopie Electronique à Transmission

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

SnPP : étain protoporphyrine IX

PBS : Phosphate Buffered Saline

HCASMCs : Cellules Coronaires Humaines Musculaires Lisses

HCAECs : Cellules Coronaires Humaines Endothéliales

CORM-3 : tricarbonylchloroglycinate de ruthénium

SDF-1 : Stromal cell-derived factor 1

SOMMAIRE

Introduction générale.....	2
CHAPITRE 1 : Revue de littérature.....	5
1. Généralités.....	6
2. Endoprothèses vasculaires.....	24
3. Les modèles d'étude de la resténose intra-stent.....	50
4. Conclusion.....	54
CHAPITRE 2 : étude in vivo de nouvelles molécules thérapeutiques pour réduire la restenose intra-stent.....	55
1. Généralités sur les molécules étudiées.....	56
2. Matériels et méthodes.....	62
3. Résultats.....	74
4. Discussion.....	89
5. Conclusion.....	96
CHAPITRE 3 : Modèles d'étude ex vivo de la resténose intra-stent.....	98
1. Introduction.....	99
2. Étude <i>Ex Vivo</i> statique des effets de l'hémine sur des artères coronaires et infra-poplitées stentées d'origine humaine.....	101
3. Élaboration d'un Bioréacteur, nouveau modèle d'étude <i>Ex Vivo</i> Hémodynamique de Resténose Intra-Stent.....	106
Conclusion et perspectives de recherche.....	117
Bibliographie.....	119
Table des matières.....	137
Table des illustrations.....	141
Production scientifique.....	145
Abstract and key words.....	147

INTRODUCTION GENERALE

PROBLEMATIQUE

La resténose intra-stent est un problème majeur de santé publique, qui survient dans 20 à 30 % des cas après implantation d'un stent coronarien et dans 40 à 50 % après implantation d'un stent infra-poplité. Elle entraîne une augmentation de la morbi-mortalité, avec une récurrence des symptômes nécessitant le plus souvent une procédure de revascularisation itérative endovasculaire ou chirurgicale conventionnelle. Les stents actifs de première génération ont permis une réduction du taux de resténose à seulement 10% en pathologie coronarienne. Toutefois, la sécurité de leur utilisation au long cours reste controversée, en raison d'un risque accru de thrombose aigüe tardive de stent. Les mécanismes présumés responsables sont un retard de cicatrisation et de ré-endothélialisation de la paroi vasculaire après implantation du stent, associé à une réaction d'hypersensibilité locale attribuée au polymère, à la drogue libérée, ou aux deux. C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche travaillent actuellement sur la conception de nouveaux stents actifs : libérant de nouvelles drogues pro-cicatrisantes limitant la resténose intra-stent sans altérer la cicatrisation et la ré-endothélialisation des mailles du stent ; libérant une drogue sans l'intermédiaire d'un polymère ou par un polymère résorbable ; ou sur des stents actifs totalement résorbables.

Les recherches actuelles sur la resténose se basent sur le modèle animal. Or, ces modèles présentent plusieurs limitations et sont particulièrement mal adaptés à l'étude des nouveaux stents actifs. D'une part, la réponse cellulaire animale à l'implantation du stent présente des similitudes à celle de l'Homme, mais ne lui est pas superposable ; d'autre part, l'impossibilité d'effectuer des prélèvements tissulaires et sanguins réguliers rend l'évaluation précise de l'élution de la drogue, de sa distribution tissulaire, ainsi que de la dégradation du polymère très difficile. Actuellement, seul un modèle *ex vivo* statique de resténose sur du tissu humain est décrit. Toutefois, compte tenu de l'importance des forces de cisaillement liées au flux sanguin dans la resténose, ce modèle semble très éloigné de la réalité, et aucun modèle d'étude hémodynamique n'est décrit.

OBJECTIFS

Les objectifs de ce travail de thèse s'inscrivent directement dans cette thématique de recherche sur la conception de nouveaux stents actifs pro-cicatrisants ainsi que dans l'amélioration des modèles d'étude *ex vivo*. Plus précisément, nos objectifs consistaient d'une part à évaluer, dans des modèles animaux, l'intérêt de 2 nouvelles molécules thérapeutiques dans la réduction de la resténose tout en limitant les risques de thrombose tardive ; et d'autre part à améliorer les outils de recherches disponibles pour l'étude des nouveaux stents actifs par la conception d'un nouveau modèle d'évaluation *ex vivo* en conditions biologiques et hémodynamiques semblables au vivant.

PRESENTATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit s'articule, outre cette brève partie introductive et la conclusion générale, autour de trois chapitres.

Le premier chapitre correspond à une revue de littérature permettant un état de l'art sur le sujet de la resténose, principalement centrée sur la pathologie coronarienne et dans une moindre mesure infra-poplitée, qui feront ensuite l'objet de nos travaux de recherche. Après une brève description de la physiologie vasculaire, nous décrivons la physiopathologie de l'athérosclérose et sa prise en charge endovasculaire par les différents stents actuellement disponibles. Nous décrivons ensuite brièvement les différents axes de recherche actuellement exploités dans la conception de nouveaux stents. Enfin, nous décrivons les différents modèles de resténose actuellement utilisés et leurs problématiques.

Le second chapitre est consacré à la présentation et à l'évaluation *in vivo* de 2 nouvelles cibles thérapeutiques pouvant avoir un intérêt potentiel dans la resténose intra-stent : l'hémine, qui est un inducteur de l'hème oxygénase-1, enzyme libératrice de monoxyde de carbone impliquée dans la réponse au stress oxydatif et la protection cardio-vasculaire ; et EP224283, un nouvel anti-thrombotique puissant associant un antagoniste des récepteurs plaquettaires GP IIb/IIIa (tirofiban), à un inhibiteur du facteur Xa (idaparinux), tous deux étudiés de façon individuelle sur la resténose dans la littérature, mais jamais conjointement.

Introduction générale

Enfin, le troisième chapitre est consacré aux modèles d'étude *ex vivo* de la resténose. Après l'évaluation du modèle *ex vivo* statique décrit dans la littérature, nous décrivons la conception et la mise en œuvre d'un nouveau modèle d'étude *ex vivo* de la resténose intra-stent et des nouveaux stents actifs, en conditions hémodynamiques de flux systolo-diastolique semblable au vivant.

CHAPITRE 1 :
REVUE DE LITTÉRATURE

1. GENERALITES

...et toi, sais tu seulement

qui a défriché le champ que tu cultives ?

1.1. HISTORIQUE DE LA CIRCULATION SANGUINE

La médecine comme bien d'autres techniques, est le fruit d'une lente élaboration. La lecture du passé, au-delà de la simple curiosité, est un devoir de mémoire vis-à-vis des pionniers et permet d'en méditer les leçons, afin d'éviter d'en répéter les erreurs.

Dès la préhistoire, nos ancêtres confrontés aux hémorragies ont su que la perte de sang entraînait la perte de la vie. En Egypte, la pratique de l'embaumement, avait familiarisé les esprits à l'ouverture des corps, favorisant le développement initial de la physiologie. Les médecins Egyptiens avaient pris conscience de l'existence du cœur et des « vaisseaux canaux » dont la fonction consistait à irriguer toutes les parties du corps. Ils imaginèrent un réseau de vaisseaux similaire aux canaux d'irrigation du Nil (Papyrus Edwin Smith, 1550 avant J.C).

Considéré comme le « père » de la médecine, Hippocrate (460-377 avant J.C) va lui donner son esprit scientifique, séparé de la magie, et basé sur l'art de l'observation et de l'examen clinique. Il est surtout connu pour sa théorie des humeurs (sang, lymphe, bile jaune et bile noire), la bonne santé résultant alors d'un juste rapport de mélange des différentes humeurs.

Premier médecin grec à pratiquer des autopsies humaines et co-fondateur de l'École d'Alexandrie de médecine, Erasistrate (330-270 avant J.C) démontra le rôle primordial du sang dans le corps humain. Il fut l'auteur d'une théorie concurrente à la théorie des humeurs affirmant que les veines

transportaient du sang et non du « pneuma », et que l'ensemble du corps était irrigué. Le cœur est reconnu comme étant au centre du réseau des artères et des veines, représenté comme une pompe qui d'un côté attire le sang produit par le foie et de l'autre permet la distribution de l'air dans le corps *via* les artères.

Après Hippocrate, l'un des plus célèbres médecins grecs de l'antiquité est probablement Galien qui paradoxalement exerça à Rome auprès de l'empereur Marc Aurèle en tant que médecin de l'école des gladiateurs de Pergame. Ce statut lui permit de faire des progrès notables en chirurgie, et il décrivit alors les valvules cardiaques, ainsi que les différences de structures entre veines et artères. Contrairement à ses prédécesseurs, il démontra que les artères transportent du sang. Néanmoins, il inventa un système vasculaire erroné sans retour, où le sang noir serait produit dans le foie, attiré puis consommé par les différents organes et dont le résidu serait la transpiration. Il décrivit également 2 sortes de sang: un sang purifié par le poumon, froid et un sang brut, chaud.

Cette thèse erronée s'imposa pendant plus de 1500 ans, protégée par une société où de tout temps les découvertes majeures étaient accueillies avec hostilité. C'est pourquoi William Harvey en 1616 écrivit, en préambule à sa description de la circulation sanguine : « *ce que je dois vous dire est si nouveau que je crains de m'attirer non seulement la jalousie de certains, mais encore l'hostilité de tous* ». Remettant en cause les principes d'Aristote et de Galien, ce Professeur d'Anatomie et Physiologiste anglais marqua une étape fondamentale dans la découverte du corps humain en décrivant la circulation sanguine dans son ouvrage "Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in animalibus" publié en 1628. Il y explique que l'idée d'un mélange entre deux sortes de sangs différents n'est pas possible et que l'hypothèse de Jean Fernel sur le lien entre la systole et l'éjection du sang est exacte. Il spécule également que, de même que pour la petite circulation, la grande circulation est un circuit fermé avec un retour du sang vers le cœur, celui-ci étant décrit comme une pompe hydraulique assurant la continuité du flux grâce à ses pulsations.

"Tels sont les organes et le tracé du transit du sang et de son circuit: d'abord de l'oreillette droite au ventricule, du ventricule à travers les poumons jusqu'à l'oreillette gauche et, de là, dans le ventricule gauche,

dans l'aorte et dans toutes les artères s'éloignant du cœur, puis dans les porosités des organes, dans les veines et, par les veines, vers la base du cœur où le sang revient rapidement...".

Il démontre sa théorie par l'expérience du garrot (Fig. 1), mais les capillaires n'étant pas connus et invisibles à l'époque, il n'arrive pas à décrire la continuité entre gros vaisseaux artériels et veineux.

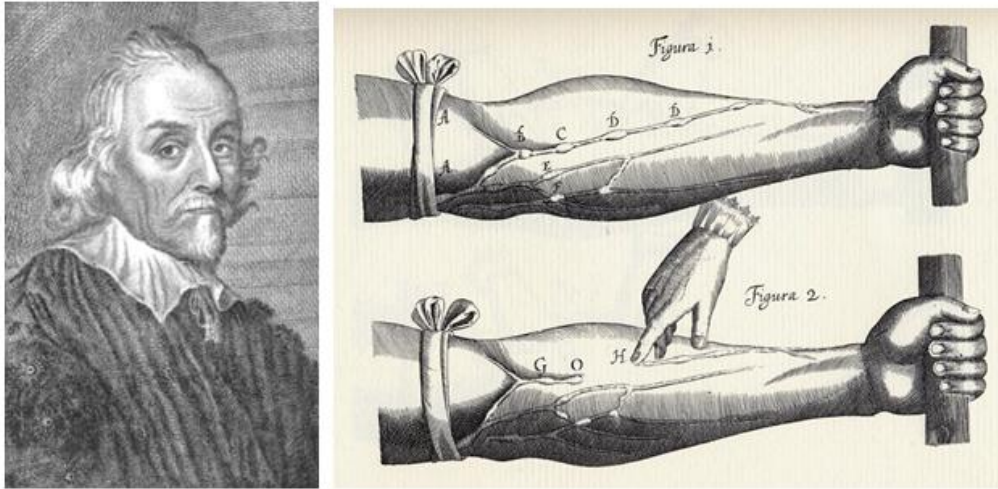


Fig. 1 : Expérience du garrot. La compression du bras par un garrot peu serré en fait ressortir les veines de l'avant-bras et entraîne le gonflement des valvules en aval du garrot (1). La pression du doigt sur la veine dilatée en force le sang à évacuer la veine entre le point où l'on appuie et la valvule suivante située en direction du cœur (2). *Guilielmi HARVEI ANGLI - Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus, 1628.*

Père de l'histologie, Marcello Malpighi décrira le premier les capillaires en 1661 grâce à ses observations du poumon en microscopie. Il bouclera ainsi les travaux de Harvey, démontrant comment le sang passe des artères aux veines dans son ouvrage intitulé *De pulmonibus observationes anatomicae*, publié en 1661 et considéré comme ouvrage fondateur de la médecine moderne.

1.2. PHYSIOLOGIE DE LA CIRCULATION ARTÉRIELLE

Actuellement, le système cardio-circulatoire est traditionnellement décrit en 2 réseaux : le réseau systémique et le réseau pulmonaire. La volémie comprend entre 4,5 et 5,5 litres de sang, dont 80% se situe dans le système à basse pression (en moyenne 15mmHg). Ce système basse pression, incluant le réseau veineux et la circulation pulmonaire, constitue un réservoir de sang pour l'organisme grâce à sa grande capacité et sa grande extensibilité.

La différence de pression moyenne entre l'aorte et le ventricule droit, ainsi que la résistance périphérique totale dans la circulation systémique, déterminent le débit cardiaque. Le débit cardiaque est d'environ 5,4 L/min au repos, permettant la vascularisation des différents organes cibles, et en particulier du muscle cardiaque lui-même pour qui 4% du débit cardiaque au repos est nécessaire. Le débit diastolique est d'environ 3,1 L/min, soit un débit maximal 1,5 fois supérieur au débit systolique qui est d'environ 2,3 L/min.

La vitesse sanguine est proportionnelle à la surface de section des vaisseaux. Le sang s'écoule dans l'aorte à la vitesse moyenne de 40 à 50 cm/sec, alors qu'il s'écoule dans les capillaires à la vitesse moyenne de 0,07 cm/sec afin d'y permettre les échanges sanguins avec les différents tissus. Les capillaires sont des conduits passifs de 5 à 10 μm de diamètre occupant une surface de l'ordre de 600 cm^2 . Les échanges à ce niveau étant basés sur la diffusion passive via les différences de concentration, des vitesses de faible amplitude y sont nécessaires.

Les deux systèmes artériels qui vont nous intéresser plus particulièrement dans ces travaux sont les artères de petit diamètre : les artères coronaires et les artères de jambe (infra-poplités).

1.2.1. ARTÈRES CORONAIRES

Les deux artères coronaires (droites et gauches) sont les premières branches de l'aorte ascendante et naissent sous l'épicarde juste en aval de la valve aortique. L'artère coronaire gauche se divise rapidement en artère interventriculaire antérieure et artère circonflexe, qui toutes deux s'anastomosent avec l'artère coronaire droite (Fig. 2). Seuls les troncs principaux conservent un

trajet épicardique et ont un diamètre de 3 à 3,5 mm à leur origine. Les branches de divisions sont rapidement intramyocardiques.

Fig. 2 : Anatomie coronarienne

Le débit coronaire est d'environ 250 ml/min au repos, et peut tripler voir quadrupler lors d'un exercice physique intense. Ce débit coronaire dépend, d'une part, de la différence de pression entre l'aorte et l'oreillette droite et, d'autre part, du diamètre des vaisseaux coronaires, lui-même dépendant de la pression transmurale (maximale en systole) et du tonus musculaire lisse pariétale des vaisseaux.

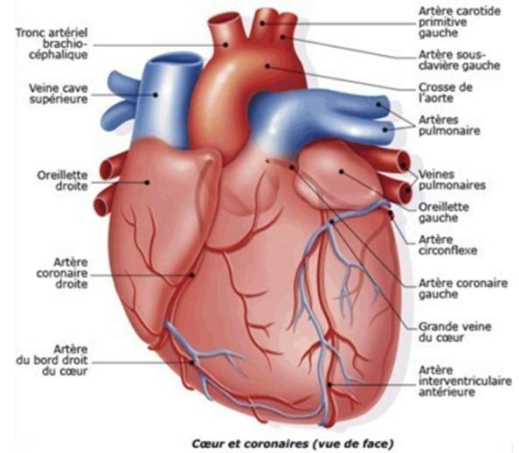
Ainsi, la perfusion coronaire s'effectue principalement durant la diastole, mais se poursuit également durant la systole, de façon variable entre 7 et 45% selon la vigueur de la contraction myocardique de l'individu [1]. Le flux coronaire augmente avec la pression artérielle, la fréquence cardiaque, la tension de la paroi ventriculaire, et la vitesse maximale de production de pression dans le ventricule gauche. Il est en moyenne de 80 à 100 ml/100g/min.

1.2.2. ARTÈRES INFRA-POPLITÉS

En condition de repos, le flux sanguin circulant aux membres inférieurs est d'environ 300 à 400 ml/min. Au niveau des artères infra-poplitées, ce flux varie de 1,5 à 6,5 ml/dl/min, avec une valeur moyenne de 3,5 ml/dl/min [2].

Après une ischémie de 5 minutes induite par garrot, la vasodilatation entraîne en réaction un pic de vitesse pouvant atteindre 30 à 40 ml/dl/min avant de revenir à son niveau basal. Lors d'un exercice modéré, le flux sanguin distribué aux membres inférieurs est multiplié par 5 à 10, soit en moyenne 30 ± 14 ml/dl/min [3].

Le différentiel de pression moyenne entre le cœur et les membres inférieurs n'est que de quelques mmHg. En effet, alors que l'onde de pression va en distalité, la pression systolique augmente et la



pression diastolique diminue, en raison de la haute résistance dans le lit artériolaire périphérique [4].

1.3. HISTOLOGIE DE LA PAROI ARTÉRIELLE

Les artères ne sont pas de simples conduits permettant la distribution sanguine aux différents organes. Elles possèdent de nombreuses propriétés, mécaniques et métaboliques, leurs permettant de s'adapter à différentes conditions. Elles répondent aux variations hémodynamiques aiguës par vasomotricité, peuvent limiter une hémorragie, restaurer l'intégrité de la paroi vasculaire ayant subi l'effraction, et s'adaptent aux conditions hémodynamiques et environnementales afin de maintenir une pression de perfusion optimale. Elles sont composées de trois tuniques : l'intima, la média et l'adventice.

1.3.1. L'INTIMA

L'intima est la tunique interne de la paroi artérielle. Elle s'étend de la lumière artérielle à la limitante élastique interne. La surface endo-luminale est composée d'une monocouche de cellules endothéliales, qui sont des cellules polygonales planes. L'intima est normalement très fine, l'endothélium reposant directement sur la limitante élastique interne, contenant seulement quelques cellules lymphocytaires, musculaires lisses et quelques fibres conjonctives. L'endothélium possède également plusieurs attaches à la limitante élastique interne qui contribuent à sa stabilité.

Initialement considéré comme une simple barrière physique entre le sang et la paroi vasculaire, l'endothélium est actuellement reconnu comme le composant le plus important de l'homéostasie vasculaire, lui conférant ses propriétés anticoagulantes, antiplaquettaires et fibrinolytiques. L'endothélium est aussi responsable du recrutement et de la transduction des cellules inflammatoires. Il régule les autres couches de la paroi vasculaire et agit en particulier sur la prolifération, la migration et l'apoptose des cellules musculaires lisses. Il peut également sécréter des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extra cellulaire [5]. Pour assurer toutes ses fonctions, l'endothélium sécrète de nombreuses substances et peut être considéré comme un organe endocrine et paracrine complexe [6].

L'oxyde nitric (NO), généré par les nitric oxide synthase endothéliales (eNOS), est le principal myorelaxant libéré par l'endothélium. Il est le principal déterminant du tonus des cellules musculaires lisses de la média, et s'oppose également aux vasoconstricteurs endothéliaux tels que l'angiotensine II et l'endothéline 1. En plus de son effet vasodilatateur, le NO exerce un rôle clef contre l'agrégation plaquettaire, contre l'adhésion et l'activation des leucocytes, et dans le maintien des cellules musculaires lisses à un état non prolifératif [7]. Il existe également d'autres dérivés endothéliaux vasodilatateurs comme la prostacycline, la bradykinine, et un facteur hyperpolarisant non caractérisé. La prostacycline agit en synergie avec le NO afin d'inhiber l'agrégation plaquettaire. La bradykinine stimule la libération de NO, de prostacycline et de facteur hyperpolarisant pour inhiber l'agrégation plaquettaire. La bradykinine joue également un rôle important dans la fibrinolyse par stimulation de la production d'activateur tissulaire du plasminogène [8].

L'endothélium produit également des substances vasoconstrictrices comme : l'endothéline, qui est le vasoconstricteur endogène le plus puissant identifié à ce jour ; les espèces oxygène réactives (ROS) ; la prostaglandine H₂ ; le thromboxane A₂ ; et l'angiotensine 2. L'angiotensine II est non seulement un vasoconstricteur, mais également un pro-oxydant qui stimule la production d'endothéline. L'endothéline et l'angiotensine 2 favorisent la prolifération des cellules musculaires lisses [8].

L'intégrité de la monocouche cellulaire endothéliale est importante dans la prévention des événements thrombotiques ou athéromateux. Pour cela, des progéniteurs endothéliaux circulants, identifiés chez l'adulte, permettent une réparation endogène par remplacement des zones d'endothélium lésé [9].

Les cellules endothéliales expriment différents types de protéines dont le rôle est de permettre la fixation des cellules sanguines telles que les plaquettes et les monocytes. Il s'agit principalement de deux composés, l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) et les vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) mais ces interactions sont complexes. Ces molécules sont présentes en permanence à la surface du lit vasculaire en faible proportion sauf en cas d'agrégation préalable [10].

Au sein de la lame basale de l'endothélium des capillaires se trouvent des cellules ramifiées nommées péricytes, qui renforcent la structure vasculaire et la régulation du flux sanguin microvasculaire. Ces péricytes jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse, à savoir dans la prolifération, la migration et la stabilisation des cellules endothéliales. En retour, les cellules endothéliales stimulent l'expansion et l'activation des précurseurs des péricytes, les principaux facteurs d'activation étant le platelet derived growth factor (PDGF), le vascular endothelial growth factor (VEGF), le transforming growth factor beta (TGF- β) et l'angiopoïétine [11].

1.3.2.LA MEDIA

La media s'étend de la limitante élastique interne à l'adventice. Bien que dans la plupart des artères une limitante élastique externe caractérise cette limite, elle n'est pas présente constamment. Néanmoins, la média se distingue facilement de l'adventice par ses multicouches serrées de cellules musculaires lisses et de fibres élastiques, orientées de façon identiques et étroitement imbriquées à des fibres de collagène de type III qui maintiennent l'ensemble. Les artères musculaires de petit calibre qui nous intéressent dans ce travail contiennent moins de fibres élastiques et de collagène, et plus de cellules musculaires lisses, comparativement aux artères élastiques (telles que l'aorte et les artères iliaques), permettant une rapide modification de diamètre artériel.

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont des cellules hautement spécialisées dont la fonction principale est la contraction et la régulation du tonus pariétal des vaisseaux sanguins, de la pression artérielle et du débit sanguin. Les cellules musculaires lisses vasculaires adultes présentent un faible taux de prolifération, une faible activité de synthèse et expriment uniquement les canaux ioniques et de signalisation moléculaires nécessaires à leur fonction contractile. Néanmoins, ces cellules conservent une plasticité remarquable et peuvent subir des changements profonds et irréversibles de leur phénotype en réponse à des variations de l'environnement [12]. Dans un vaisseau mature, les cellules musculaires lisses vasculaires ont un phénotype différencié « contractile », caractérisé par l'expression de marqueurs contractiles spécifiques jouant un rôle déterminant dans la régulation de la contraction (chaîne lourde de la myosine, α -actine, h-caldesmone et calponine). Elles synthétisent également les éléments de la matrice extra cellulaire

comme les fibres élastiques, le collagène et les protéoglycanes, qui confèrent à la paroi ses propriétés mécaniques, et sont largement impliquées dans le métabolisme.

Lors d'une agression de la paroi vasculaire, les cellules musculaires lisses vasculaires d'une grande plasticité évoluent vers un phénotype indifférencié ayant une forte capacité de prolifération, de migration, et de synthèse de matrice extracellulaire, exprimant peu les marqueurs contractiles. Cette réponse à long terme est impliquée dans de nombreux mécanismes pathologiques tels que l'athérosclérose, le remodelage vasculaire et l'hypertension artérielle [12].

1.3.3.L'ADVENTICE

L'adventice est composé de tissu conjonctif et d'un réseau de vasa vasorum. Ce réseau est constitué d'artérioles, de capillaires et de veinules, permettant la vascularisation des couches externes de la paroi artérielle (les premiers 0,5 mm de couches interne étant nourris par diffusion des nutriments). L'adventice est également composé de nerfs innervant les cellules musculaires lisses et définissant le tonus musculaire et la vasoconstriction. L'épaisseur et l'organisation de l'adventice est variable selon le type d'artère.

Dans l'adventice se trouve également des fibroblastes. Les fibroblastes sont impliqués dans la prolifération, l'apoptose, la migration et les modifications de phénotypes des cellules musculaires lisses de la média sous jacente. Lors d'une agression vasculaire, ces cellules peuvent modifier leur comportement et devenir des cellules semblables aux cellules musculaires lisses, les myofibroblastes. Ces myofibroblastes peuvent alors migrer à travers les différentes tuniques et contribuer à la sécrétion de matrice extra-cellulaire et au remodelage vasculaire [13].

1.4.L'ATHÉROSCLÉROSE

L'oblitération des artères par l'athérome est connue depuis les travaux anatomo-pathologiques du siècle des lumières et de nombreux auteurs l'ont étudiée au cours du XIX^{ème} siècle, mais elle est restée inaccessible à toute thérapeutique. C'est finalement le pathologiste allemand Félix Marchand qui en 1904 introduisit le terme « d'athérosclérose », dont l'étymologie provient du grec « athéré » qui illustre la matière grasseuse et « scleron » qui exprime la notion de rigidité.

1.4.1. **PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ATHÉROSCLÉROSE**

L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique qui affecte l'ensemble du réseau artériel de gros et moyen calibre, et tout particulièrement les artères coronaires, les troncs supra-aortiques et les artères des membres inférieurs.

C'est Ross en 1973, qui décrit les bases de la compréhension des mécanismes impliqués dans l'athérome [14]. Il décrit que l'athérosclérose est, au moins en partie, le résultat de la réponse cellulaire à une altération et à une dysfonction endothéliale. En 40 ans, cette théorie a évolué, mais il est toujours admis aujourd'hui que le processus physiopathologique initial est une altération des cellules endothéliales, entraînant un dysfonctionnement. Cette dysfonction a pour conséquence une modification de la perméabilité endothéliale, de ses fonctions adhésives et de sa réponse aux facteurs stimulants extérieurs. Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses interagissent alors via des mécanismes immuno-inflammatoires avec les monocytes, les lymphocytes T et les plaquettes pour former les composants de la réponse cellulaire fibro-proliférative, qui résulte à terme à la formation de la plaque d'athérosclérose.

1.4.1.1. **LÉSIONS HISTOLOGIQUES DE L'ATHÉROSCLÉROSE**

Les lésions d'athérosclérose sont considérées comme étant « avancées » sur des caractéristiques histologiques, où l'accumulation de lipides, de cellules et de composants de la matrice, est associée à une désorganisation structurelle, une cicatrisation et un épaissement de l'intima, ainsi qu'à une déformation de la paroi artérielle.

Ces caractéristiques ont été décrites par l' « American Heart Association (AHA) » en 1994 [15, 16]. On en distingue 6 stades évolutifs (Fig. 3) :

- Le type I est caractérisé par une augmentation du nombre de macrophages, associée à une accumulation de lipides dans ces macrophages, qui forment alors des cellules spumeuses.
- Le type II comporte les premières lésions visibles sans grossissement : les stries lipidiques. Celles-ci sont caractérisées par des couches de cellules spumeuses associées à des cellules musculaires lisses vasculaires contenant des lipides. On note également la présence d'un

nombre élevé de macrophages sans lipides, de lymphocytes T et de mastocytes dans ces lésions, ainsi qu'un renouvellement anormalement rapide des cellules musculaires lisses, des cellules endothéliales et des cellules spumeuses.

- Les types I et II sont considérés comme des lésions précoces. Cet d'épaississement de l'intima est un mécanisme d'adaptation pariétal en réponse à une force mécanique, présent chez chaque individu quelque soit son taux de lipides sériques. L'athérome se développe ensuite préférentiellement dans ces zones d'épaississement intimal.
- Le type III correspond à des lésions intermédiaires, similaires au type II, mais contenant des plages caractéristiques de gouttelettes lipidiques extracellulaires répandues parmi les couches de cellules musculaires lisses. Ces gouttelettes sont situées sous les macrophages et les cellules spumeuses, ce qui perturbe l'agencement cohérent des cellules musculaires lisses.
- Le type IV correspond à de l'athérome. Il est caractérisé par une collection bien organisée de lipides extracellulaires situés juste sous l'intima, appelée « noyau lipidique ». Ce noyau correspond à la confluence des gouttelettes lipidiques présentes au stade III et peut parfois contenir des particules de calcium. La surface située entre ce noyau lipidique et la surface endothéliale contient des macrophages, des cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses, associés à des lymphocytes T et des mastocytes. Au stade IV, les lésions entraînent une sténose visible de la lumière artérielle mais qui n'est pas significative et par conséquent qui reste asymptomatique.
- Le type V est caractérisé par la formation de tissus conjonctifs fibreux proéminents qui forment une chape fibreuse. La sténose artérielle est alors significative et symptomatique.
- Le type VI correspond à des plaques de type IV ou de type V compliquées de rupture intimale correspondant à une hémorragie sous plaque ou une ulcération. La rupture de la chape fibreuse expose du matériel thrombogénique au flux sanguin, initiant l'agrégation plaquettaire et l'activation de la cascade de la coagulation par exposition du facteur tissulaire. L'activation plaquettaire et la formation de fibrine, associée à l'avulsion de la plaque thrombogène dans la lumière artérielle, entraîne alors une occlusion soudaine. Ces lésions sont responsables de la majorité de la morbi-mortalité liée à la maladie athéromateuse, entraînant fréquemment une ischémie aiguë de l'organe concerné.

Les stades IV, V et VI correspondent à des stades avancés de la maladie athéromateuse.

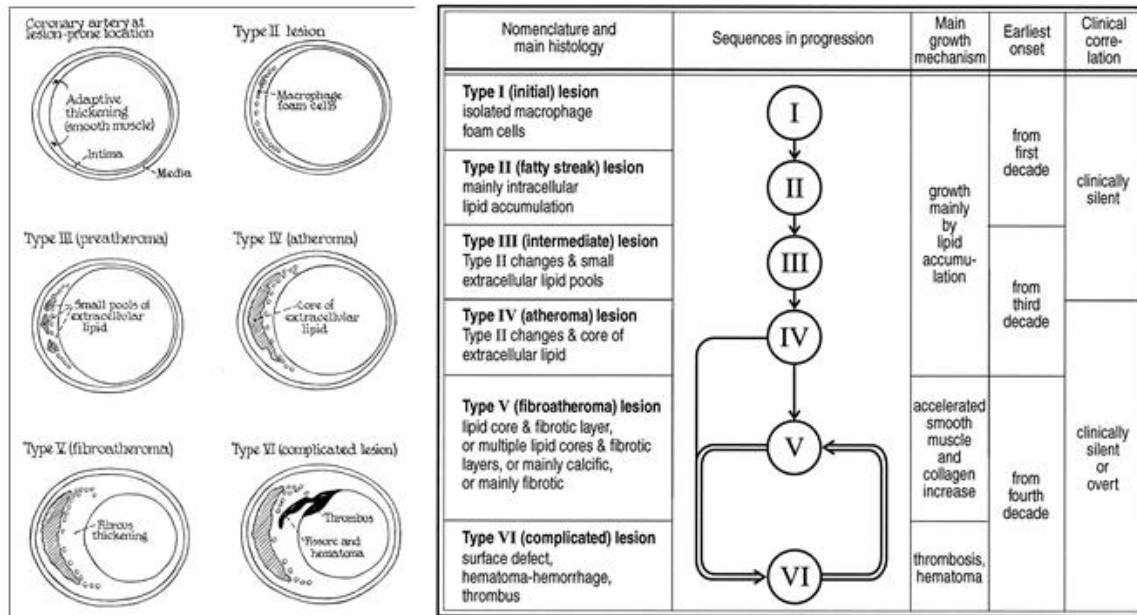


Fig. 3 : Stades évolutifs de l'athérome selon l'American Heart Association [15, 16].

La classification de l'AHA a été réévaluée en 2000 par Virmani *et al.* [17], en raison de sa complexité et du fait qu'elle implique une progression linéaire des lésions, ce qui n'est pas toujours le cas en pratique. En effet, en ce qui concerne l'athérome coronarien, il est actuellement prouvé que des lésions non fatales d'athérome peuvent contenir des zones de rupture et qu'à l'inverse, certaines lésions fatales ne contiennent pas de zone de rupture. Il existe donc d'autres mécanismes que la rupture de plaque expliquant une thrombose aiguë. De plus, au moins 50% des thromboses aiguës surviennent sur des plaques entraînant des sténoses non significatives (<70%) [17].

Virmani *et al.* [17] proposent donc 7 catégories de lésions, incluant : le xanthome intimal, l'épaississement de l'intima, l'épaississement pathologique de l'intima, la chape fibreuse (correspondant au tissu conjonctif recouvrant les lipides), la mince chape fibreuse (<65 µm d'épaisseur), le nodule calcifié et la plaque fibrocalcique. Les principales caractéristiques définissant ces catégories sont : l'accumulation de lipides formant la chape fibreuse, la formation d'un noyau nécrotique, l'épaississement ou l'amincissement de la chape fibreuse et la thrombose. Certains mécanismes comme l'angiogenèse, l'hémorragie intraplaque, l'inflammation, les

calcifications, la mort cellulaire ou la protéolyse, peuvent entraîner des modifications spécifiques de la plaque ou une thrombose.

Ainsi, la proportion des différents composants de la plaque varient, et il semble que les plaques coronariennes « vulnérables », à risque de thrombose, soient les plaques à chape fibreuse mince (<65 µm d'épaisseur), avec un noyau lipidique important (>40% de la surface totale de la lésion), et un haut degré d'inflammation [17, 18]. Au contraire, soulignant l'hétérogénéité des plaques, l'athérome carotidien à risque de rupture se présente sous forme de plaques très fibrineuses entraînant des sténoses sévères.

De même, les calcifications pariétales sont variables d'un site vasculaire à l'autre. Dans une analyse histologique récente, les plaques vasculaires carotidiennes ont montré une constitution à 75% de chape fibreuse alors que les plaques fémorales ont montré 93% de plaques fibrocalciques, résultats confirmés par des analyses biochimiques retrouvant un taux plus élevé de calcium et moins élevé de cholestérol dans les plaques fémorales comparativement aux plaques carotidiennes [19].

Les plaques athéromateuses vulnérables sont également fréquemment associées à un élargissement du diamètre artériel, mécanisme compensatoire de la réduction de lumière circulante. La transition complexe survenant entre un élargissement compensatoire et une rupture de la plaque, ne vient pas seulement de l'intima. En effet, la rupture de la limitante élastique interne, en permettant l'expansion des mécanismes athéroscléreux à la média, est reconnu comme une caractéristique des plaques d'athérome compliquées [20]. Un processus inflammatoire avec présence de mastocytes au niveau de l'adventice a également été décrit [21].

1.4.1.2. MÉCANISMES CELLULAIRES IMPLIQUÉS DANS L'ATHÉROSCLÉROSE

La dysfonction endothéliale est une étape cruciale dans le développement précoce de l'athérosclérose, et participe également au développement de la plaque et à la survenue de complications vasculaires. Elle est caractérisée par une rupture de l'homéostasie vasculaire, comprenant une altération de l'équilibre vasodilatation / vasoconstriction, une perméabilisation

de l'endothélium, une agrégation plaquettaire, une adhésion leucocytaire, et une production de cytokines pro-inflammatoires [22].

Les mécanismes immuno-inflammatoires innés et adaptatifs sont impliqués dès les stades précoces des lésions d'athérome, car c'est l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion par l'endothélium activé qui va entraîner le recrutement des monocytes et des lymphocytes [23]. L'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales s'effectue par leurs CAMs (cell adhesion molecule), ce qui leur permet de migrer à travers la barrière endothéliale et de rapidement se différencier en macrophages, aboutissant à la formation de stries lipidiques. Les macrophages activés produisent de grandes quantités d'endothéline, favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Les dépôts de cholestérol présents dans les lésions d'athérome semblent provenir majoritairement du LDL (low density lipoprotein) circulant ayant pénétré dans l'intima. La conversion des macrophages en cellules spumeuses vient de leur absorption incontrôlée du LDL présent dans l'intima. Or, le taux de cholestérol cellulaire des macrophages régulant négativement l'expression des récepteurs de LDL sur les macrophages, leur exposition, même à de fortes concentrations de LDL, ne conduit normalement pas à leur sur-absorption de LDL ou à la formation de cellules spumeuses [24]. Cependant, dans la maladie athéromateuse, le LDL subit diverses modifications au sein de l'intima, dont la principale est l'oxydation [25, 26], qui permettent l'augmentation de son taux d'absorption par les macrophages [27].

Il semble que le LDL oxydé joue un rôle très précoce dans l'initiation de la réaction inflammatoire vasculaire. Il stimule l'expression des molécules d'adhésion des cellules endothéliales, a une activité chimiotactique sur les monocytes et favorise ensuite leur différenciation en macrophages, tout en inhibant leur mobilité. Puis les monocytes et les lymphocytes activés sécrètent eux même une grande quantité de cytokines qui, à leur tour, activent les cellules endothéliales et musculaires lisses, ainsi que les monocytes/lymphocytes, conduisant à une réaction inflammatoire auto-entretenu et moins dépendante des LDL oxydés. La régulation de cette réponse immuno-inflammatoire implique principalement deux cytokines anti-inflammatoires, l'interleukine (IL)-10 et le transforming growth factor (TGF)- β , qui jouent un rôle essentiel [23]. A un stade plus avancé, plusieurs cytokines inflammatoires (comme IL-1,

Tumeur Necrosis Factor (TNF)- α et interferon (IFN)- γ sont impliquées dans l'apoptose des macrophages et des cellules musculaires lisses, conduisant respectivement à l'élargissement du noyau lipidique et à l'amincissement de la chape fibreuse favorisant son risque de rupture. Enfin, les cytokines inflammatoires altèrent profondément les propriétés anti-thrombotiques de l'endothélium, favorisant la formation de thrombus [28].

Les cellules spumeuses participent au développement des lésions athéromateuses de plusieurs façons. Les lésions d'athérome évoluées possèdent un gros noyau riche en cholestérol qui semble être essentiellement dérivé de la nécrose et / ou de l'apoptose de ces cellules spumeuses [29]. La transformation des macrophages en cellules spumeuses affecte également l'expression et la sécrétion de différentes enzymes et protéines [30, 31]. Les cellules spumeuses activées contiennent une certaine quantité de produits d'oxydation des lipides, puissants médiateurs de la fonction des macrophages [32], et, enfin, elles sécrètent des protéinases (matrix metalloproteinases, MMPs) et des glycosidases (héparanase), qui dégradent les protéines de la matrice extracellulaire et en modifient la composition, favorisant ainsi l'affaiblissement de la chape fibreuse et la rupture de plaque [24].

Les mécanismes de calcification artérielle sont encore mal élucidés, mais semblent passer par deux principaux phénomènes : l'induction de l'ostéogénèse et la perte des inhibiteurs de la déminéralisation [33]. Il semblerait que la triade OPG/RANK/RANKL participe aux multiples processus régulateurs de cette calcification vasculaire [19].

Plus récemment, il a été établi qu'outre les « plaques vulnérables » à risque de thrombose par rupture et exposition du facteur tissulaire au flux sanguin, c'est dans certains cas un « sang vulnérable » qui pourrait favoriser la thrombose sur une plaque érodée. En effet, deux formes distinctes de facteur tissulaire circulant ont été décrites. L'une associée à des débris cellulaires, probablement originaires de cellules apoptotiques. L'autre est une forme inactive, qui doit être activée pour exercer son activité thrombogénique. Un fort taux de facteur tissulaire circulant a été associé à certains états pathologiques à fort risque de complications thrombotiques [34].

Enfin, un autre mécanisme d'évolution brutale et de déstabilisation de la plaque d'athérome est décrit, il s'agit de l'hémorragie intra-plaque. En effet, Il se développe une néovascularisation de

la plaque intimale, provenant majoritairement de l'adventice contenant un grand nombre de vasa vasorum. Cette migration de néovaisseaux, favorisée lors d'une brèche dans la média, est caractérisée par des ramifications anormales et un endothélium immature. Ces néovaisseaux immatures sont une source d'hémorragie intra-plaque, par fuite ou rupture des vasa vasorum. Les conséquences en sont une accumulation de phospholipides et de cholestérol libre dérivé des érythrocytes, l'accumulation d'érythrocytes favorisant le passage d'une lésion stable à une lésion instable avec risque de rupture.[35]

Les plaquettes ne semblent pas intervenir aux stades précoces de développement de l'athérome, mais dans les stades avancés. En réponse à l'activation de l'endothélium elles vont pouvoir y adhérer et relarguer des molécules affectant la coagulation, la vasomotricité, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. Parmi les facteurs de croissance libérés, le plus important dans l'athérogenèse est le platelet derived growth factor (PDGF). De plus, les plaquettes libèrent le transforming growth factor β (TGF- β), le facteur de croissance épidermique, l'insuline-like growth factor-1 (IGF-1), la thrombospondine, la thromboxane A₂, la P-sélectine, la sérotonine, l'adénosine diphosphate et l'histamine. En plus de leur rôle dans l'évolution chronique de la maladie, leur rôle est essentiel dans la thrombose aiguë d'artère [36].

1.4.1.3.CONTRAINTES DE CISAILLEMENT

L'athérosclérose se développe préférentiellement au niveau des bifurcations ou d'angulations, ce qui suggère l'importance des forces de cisaillement dans ce phénomène. Les contraintes de cisaillement font varier les taux de sécrétion (facteurs de croissances, chemoattractants...), les propriétés biochimiques ou encore les phénotypes cellulaires. Elles agissent comme un régulateur de l'adhésion moléculaire via les modifications du taux d'ICAM-1 en surface de l'endothélium, elles influencent la synthèse d'attracteurs d'ions Ca^{2+} participant à la calcification des plaques d'athérome, ou encore influencent l'adaptation et l'intégration lipidique dans l'intima [36]. Il a été montré récemment en pathologie coronarienne que les segments à faible force de cisaillement développent une vitesse de progression de la plaque et un remodelage constrictif plus rapide que les segments à force de cisaillement intermédiaire. Toujours par comparaison aux segments à force de cisaillement intermédiaire, les segments à force de cisaillement élevée développent un noyau nécrotique plus important ainsi qu'une plus grande densité de calcium, ainsi qu'une

régression des tissus fibreux et fibro-adipeux, et un remodelage expansif excessif, suggérant une évolution vers un phénotype plus vulnérable de la plaque [37] (Fig. 4).

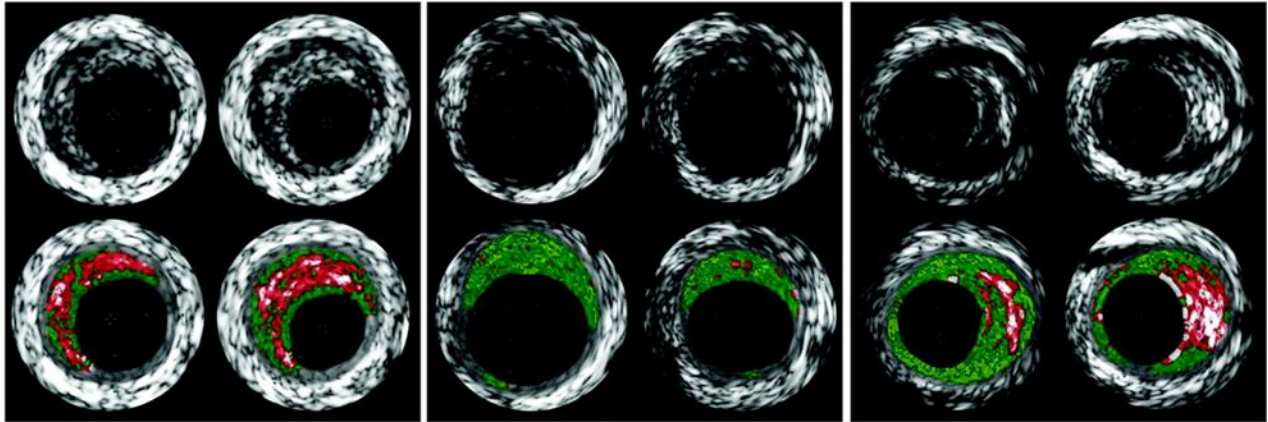


Fig. 4 : Exemples de segments artériels venant d'ultra-sons intravasculaires et d'histologie virtuelle démontrant les modifications de la plaque selon une force de cisaillement faible (gauche), intermédiaire (au centre) ou élevée (à droite) selon Samady *et al.*[37].

1.4.1.4.FACTEURS DÉCLENCHANT D'ATHÉROSCLÉROSE

Les facteurs cliniques de risques cardio-vasculaires à l'origine de la formation de la plaque d'athérome sont aujourd'hui bien connus. On peut citer :

- le tabac, qui non seulement est toxique pour les cellules endothéliales [38], mais inhibe la réparation cellulaire de l'endothélium [39]. Il altère la régulation vasomotrice de la paroi vasculaire par inhibition de la production de NO. Le NO étant également un régulateur de la prolifération des cellules musculaires lisses et de l'adhésion des plaquettes et des macrophages [36].
- l'hypertension artérielle entraîne des modifications fonctionnelles et morphologiques des cellules endothéliales qui ont alors un volume augmenté et font protrusion dans la lumière artérielle [40]. L'hypertension artérielle entraîne également une prolifération des cellules musculaires lisses et une accumulation de matrices extracellulaires [41].
- la dyslipidémie, via le LDL qui est absorbé puis oxydé par les cellules endothéliales et qui joue un rôle majeur dans l'altération de l'endothélium. Le LDL oxydé réduit la production

et le relargage du NO par les cellules endothéliales et stimule la production de cytokines et de facteurs pro-inflammatoires [36].

- le diabète sucré, dont l'hyperglycémie stimule la prolifération des cellules musculaires lisses et la formation de matrices extracellulaires [42]. L'hyperglycémie provoque également une altération de l'endothélium et compromet sa régénération, entraînant un état d'hypercoagulation et une altération de la relaxation artérielle.

Plus récemment, le chromosome 9P21 a été décrit en 2007 comme étant associé à la pathologie coronarienne. Il est considéré aujourd'hui comme étant le marqueur génétique le plus fiable de cette pathologie coronaire, et a également été associé à d'autres maladies cardio-vasculaires telles que les plaques d'athérome carotidien, les anévrismes, l'artériopathie périphérique, les accidents vasculaires cérébraux, l'insuffisance cardiaque. De plus, son absence d'association aux facteurs de risques cardio-vasculaires établis suggère un mécanisme entièrement nouveau [43].

1.4.2. RETENTISSEMENT CLINIQUE DE L'ATHÉROSCLÉROSE

On distingue deux types de complication de l'athérosclérose : la sténose et la thrombose. La sténose est considérée comme significative à partir de 70% de réduction de surface de l'artère (soit 50% de réduction de diamètre). Le retentissement clinique reflète la restriction de l'apport sanguin au niveau du lit capillaire. Cette insuffisance d'apport sanguin ne dépend pas seulement de la sévérité de la sténose mais également de sa localisation et de la capacité de l'organisme à compenser cette sténose par une augmentation du débit cardiaque, par le développement d'artères collatérales ou par la vasodilatation des artères d'aval, des artérioles périphériques et des sphincters pré-capillaires.

Au niveau du myocarde, la symptomatologie la plus fréquente de l'athérosclérose est l'angor. Il se caractérise par une douleur précordiale gauche constrictive irradiant fréquemment dans la mâchoire et le membre supérieur gauche, qui apparaît lors d'un exercice physique. Il correspond à l'accumulation de métabolites acides dans le muscle cardiaque hypoxique lors d'un effort. L'hypoxie myocardique est caractérisée par la production d'acide lactique provenant de la glycolyse anaérobie [44] qui entraîne une limitation importante de la réserve cardiaque. La thrombose aiguë d'une artère coronaire par thrombose sur plaque ou par embolie entraîne la

survenue d'un syndrome coronarien aigu avec dysfonctionnement du myocarde et infarctus myocardique.

Au niveau des membres inférieurs, l'athérosclérose entraîne une claudication intermittente avec limitation du périmètre de marche lorsque le flux sanguin n'est pas capable d'assurer l'augmentation d'activité métabolique requise lors de l'activité musculaire. Une aggravation de la pathologie entraîne une inadéquation du flux sanguin y compris au repos, entraînant des douleurs de décubitus ou des troubles trophiques.

2. ENDOPROTHÈSES VASCULAIRES

2.1. HISTORIQUE

C'est René Leriche (Fig. 5) qui effectua le premier un traitement de l'artériopathie oblitérante.



Fig. 5 : René Leriche entouré de ses élèves, notamment Mickael DeBakey, Jean Cid Dos Santos, René Fontaine et Jean Kunlin.

En 1913, il découvrit en laboratoire que l'excision de l'adventice péri-artériel produisait une vasodilatation régionale, y compris sur une artère oblitérée. En 1924, il rapporta l'effet vasodilatateur prolongé de la sympathectomie lombaire. Ainsi, il fut à l'origine de la

sympathectomie et de l'artériectomie qui restèrent le seul traitement de l'artériopathie oblitérante pendant près d'un quart de siècle.

L'artériectomie fut ensuite remplacée par la thrombo-endartériectomie, après sa publication en 1947 à l'Académie de Chirurgie à Paris par son inventeur Jean Cid Dos Santos. La technique fut ensuite améliorée, puis étendue aux différents territoires artériels, en particulier carotidien en 1952 par Mickael DeBackey. Le premier pontage veineux fémoro-poplité long suivi en 1948 et fut réalisé par Jean Kunlin, qui présenta les 8 premiers cas à l'Académie des Sciences dont un seul s'était oblitéré. Enfin, les premières prothèses artérielles synthétiques furent inventées par Arthur Voorhees aux États-Unis, qui après plusieurs expérimentations chez le chien, implanta la première prothèse en Vinyon (fibre synthétique) chez l'homme en 1953, chez un patient opéré d'une rupture d'anévrisme alors qu'aucune homogreffe n'était disponible. Ce premier patient décéda de coagulopathie, mais le second patient survécut.

En 1937, Ochsner et DeBakey publient "The surgical treatment of coronary Disease", dans lequel ils décrivent les trois approches techniques de l'époque pour traiter la cardiopathie ischémique : la thyroïdectomie, la sympathectomie et le développement de la collatéralité myocardique. Le concept du pontage coronarien fut initialement proposé par Carrel en 1910, après avoir expérimenté cette technique sur le chien [45]. L'idée fut reprise en 1961 par DeBakey et Henley qui publièrent leurs travaux expérimentaux sur le chien [46]. Ils effectuaient des pontages en Dacron entre l'aorte thoracique descendante et l'artère inter-ventriculaire antérieure ou la circonflexe. En 1960, Crawford rapporta le premier succès de réparation coronaire par patch veineux chez le chien, et c'est Sabiston qui en 1962 réalisa le premier pontage veineux entre l'aorte ascendante et l'artère coronaire droite, même si le patient mourut quelques jours plus tard. Le premier succès de pontage aorto coronarien fut publié par Garrett sept ans après sa réalisation [47].

Parmi l'explosion des techniques qui suivit, l'innovation principale des années 1970 fut l'invention des dilatations artérielles. La première coronarographie fut rapportée en 1959 et en janvier 1964, un radiologue de l'Ouest des États-Unis, Charles Dotter (Fig. 6), observait qu'il parvenait à recanaliser certaines artères iliaques lors d'artériographies. Il commença par traiter les patients en poussant en force des cathéters coaxiaux avec des succès variés. L'année suivante, il

utilisa un ballon d'embolectomie de Fogarty afin de dilater une artère iliaque, qui resta perméable pendant quinze ans. Dix ans plus tard, Andréas Gruntzig inventa un ballon à double lumière qui pouvait être introduit sur guide et qui était suffisamment solide pour écraser l'athérome, tout en ayant un diamètre maximal limité afin d'éviter la rupture. Dès lors, la dilatation artérielle fut largement utilisée, sur les artères périphériques comme sur les artères coronaires.



Fig. 6 : E. Zeitler, A. Gruntzig et C. Dotter (de gauche à droite), pionniers du traitement endovasculaire des oblitérations artérielles.

Lorsque le dentiste anglais Charles Stent (1807-1885), mit au point un appareillage destiné à la correction de l'alignement dentaire, il ne pensait probablement pas que des années plus tard, son nom serait associé à une prothèse métallique endovasculaire. L'origine du terme « stent » lui est en effet imputée, bien que l'étymologie exacte du mot soit sujette à controverses.

Un stent est une prothèse endoluminale conçue en échafaudage afin de maintenir la lumière artérielle perméable. Il permet d'éviter le ressaut élastique précoce, principale limitation de la technique d'angioplastie pouvant aboutir à une thrombose aiguë de l'artère. Il permet également de limiter les dissections et de réduire la resténose comparativement à l'angioplastie simple. Il est actuellement admis que l'implantation d'un stent apporte un bénéfice en terme de resténose et de revascularisation, particulièrement en pathologie coronarienne [48].

Les pionniers du développement de ces stents travaillèrent sur des modèles animaux, le plus souvent canins, réalisant des stents en bobine de nitinol [49, 50] et des stents grillagés en acier inoxydable montés sur ballon [51]. Ces travaux ont contribué aux premières implantations chez

l'homme en 1986 de stents nitinol auto-expansibles dans les artères iliaques, fémorales et coronaires [52].

2.2. ENJEUX ÉCONOMIQUE ET SOCIÉTAUX

Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'Organisation Mondiale de la Santé estime à 17,3 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 30% de la mortalité mondiale totale. Parmi ces décès, on estime que 7,3 millions (40%) sont dus à une cardiopathie ischémique (athérome coronarien) et 6,2 millions à un accident vasculaire cérébral (statistiques datant de 2008). Plus de 80% des décès interviennent dans des pays à revenu moyen ou faible et touchent presque également hommes et femmes. D'une manière générale, la morbidité et la mortalité des maladies cardiovasculaires, et en particulier celles des cardiopathies ischémiques, sont en augmentation. D'ici 2030, près de 23,6 millions de personnes décèderont de maladie cardio-vasculaire [53].

En Europe, les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de 40% des décès, soit environ 2 millions de décès chaque année [54]. En France en 2008, selon la Fédération Française de Cardiologie [55] :

- 147 000 personnes sont décédées de maladies cardiovasculaires, soit 28% des décès (1^{ère} cause de mortalité chez la femme et seconde chez l'homme)
- 313 000 personnes ont été hospitalisées pour une pathologie coronarienne, dont 167 000 pour un syndrome coronaire aigu ou un infarctus du myocarde, et 41 000 personnes en sont décédées
- 800 000 personnes souffrent d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs responsable de 5 000 amputations/an

La situation est semblable en Amérique du nord où les maladies cardiovasculaires représentent près d'un tiers des décès (35% aux États-Unis et 33% au Canada).

Dès 1994, l'utilisation des stents a connu une diffusion extrêmement rapide, grâce en outre à la mise sur le marché concomitante d'agents antiplaquettaires complémentaires hautement

spécifiques et efficaces. Porté par leur côté mini-invasif particulièrement adapté au vieillissement de la population, leur utilisation se développe de façon exponentielle. Néanmoins, malgré l'utilisation d'un stent, le taux de resténose reste relativement élevé, variant de 20 à 30% en pathologie coronaire à 6 mois et atteignent 50% au niveau des artères de jambe. L'utilisation de substances pharmacologiques par voie systémique pour réduire la resténose s'est avérée inefficace. Des stents actifs libérant ces substances localement ont été testés chez l'animal dès 2001, montrant une efficacité dans la réduction de la resténose [56].

En 2001, on dénombre 489 000 poses de stent en Europe et 466 000 aux États-Unis. En 2005, le budget mondial des stents représentait 5 000 M€ dont 3 400 M€ de stents actifs. En France en 2005, le budget est de 185 M€ (120 000 stents) dont 160 M€ de stents actifs (81 000 stents actifs), ce qui représente une expansion du budget de 180% comparativement à l'année 2003 (112 000 stents dont 7% de stents actifs). Cela s'explique en partie par l'explosion du nombre d'implantation de stents actifs à cette époque, leur prix étant 2,25 fois plus élevé que celui d'un stent nu [57]. Le rapport d'activité du Comité Économique des Produits de Santé (CEPS) de 2011 montre que suite aux craintes soulevées en 2006 sur les risques liés à l'utilisation des stents actifs, le marché a connu une diminution significative (- 14,5 %) entre 2006 et 2007. La remontée des ventes ayant eu lieu progressivement par la suite (+ 7,6 % en 2011) (Fig. 7). Toutefois, la progression des ventes est compensée par la baisse des prix des dispositifs, permettant actuellement un équilibre du budget [58].

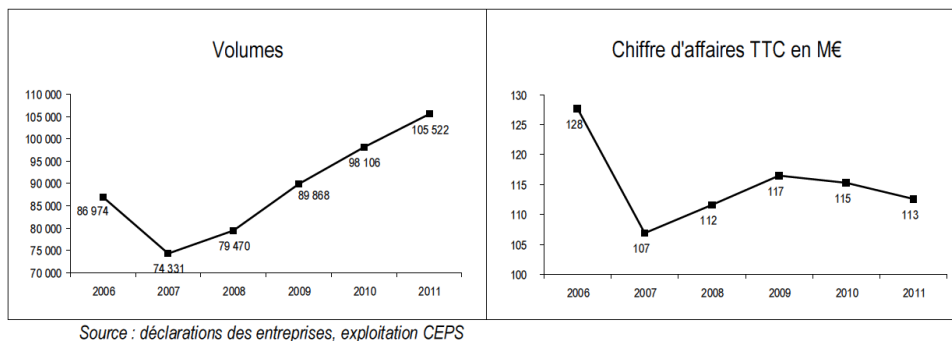


Fig. 7 : Évolution des ventes de stent actif entre 2006 et 2011.

2.3. STENTS NUS

Nous nous restreindrons ici à la description des stents coronariens et des stents infra-poplités qui feront l'objet de ce travail. Ils présentent les plus petits diamètres et sont le plus sujets à la resténose.

2.3.1. GÉNÉRALITÉS

Les stents sont des maillages métalliques dont la structure et les propriétés peuvent largement influencer les résultats à court ou à long terme. Dès les premières implantations, la principale caractéristique nécessaire aux stents était la facilité d'implantation, donc la bonne radio-opacité ainsi qu'un profile et une flexibilité permettant un passage facile des lésions. Un stent nécessite également : une bonne force radiale afin d'éviter le ressaut élastique ; une solidité du matériel utilisé puisqu'il est démontré que des mailles fines permettent de réduire la resténose ; une inoxydabilité compte tenu de l'exposition permanente au milieu sanguin contenant du chlore et de l'oxygène dissout, ainsi qu'à une température élevée ; une biocompatibilité.

- Configuration :

Les stents actuels peuvent être divisés en deux groupes : auto-expansibles ou expansibles sur ballon. Dans chacun des groupes, on distingue les stents à cellules fermées ou les stents à cellules ouvertes, ayant des souplesses variables (Fig. 8). Les stents à cellules fermées ne modifient pas leur forme y compris lorsqu'ils sont implantés dans des artères incurvées, alors que les stents à cellules ouvertes s'adaptent aux implantations sinueuses [59].

- Matériaux :

Les stents coronaires sont classiquement expansibles sur ballon et en acier inoxydable 316L (316L selon la norme américaine, X2CrNiMo en Europe), qui est un acier fortement allié contenant principalement du chrome, du nickel et du molybdène. Il présente différentes propriétés adaptées à la confection du stent : le chrome lui confère son inoxydabilité, il se travaille facilement, son recul élastique est très faible et sa découpe laser ainsi que son

électropolissage permettent l'élimination des impuretés de surface, améliorant sa biocompatibilité. Néanmoins, il occasionne parfois une biotoxicité.

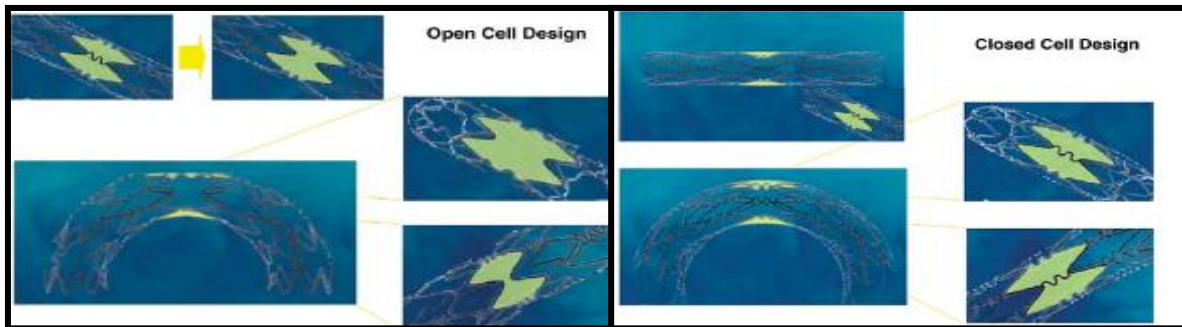


Fig. 8 : Configuration des stents en cellules ouvertes ou fermées selon Hara *et al.* [59]

Le nitinol est un matériau à mémoire de forme, alliage de nickel et de titane, qui est utilisé pour les stents auto-expansibles. Si les stents auto-expansibles ont été les premiers stents implantés au niveau coronarien, ils ont rapidement été remplacés par les stents expansibles sur ballon et sont utilisés actuellement au niveau des artères périphériques de gros calibre. Le nitinol est biocompatible, résistant et largement déformable. Mais ses propriétés mécaniques font qu'il exerce une force radiale permanente sur la paroi et provoque un élargissement du vaisseau au long cours. Les stents auto expansibles sont positionnés dans des systèmes de largage comprenant une gaine externe qui se rétracte pour déployer le stent. Les dimensions des systèmes de largage peuvent poser problème pour naviguer dans les petites artères. Ils ont un moins bon profil et une moins bonne précision de largage [60]. De plus le nitinol est soupçonné de produire une réaction inflammatoire en rapport avec l'activation des monocytes [61].

Plusieurs études ayant montré qu'une maille plus fine permet de réduire la resténose, l'évolution s'est faite vers l'utilisation de matériaux haute résistance permettant l'affinement des mailles. L'alliage cobalt-chrome (Fig. 9) permet à la fois une plus grande résistance et une augmentation d'atténuation des rayons-X comparativement à l'acier inoxydable, donc la réalisation de mailles plus fines sans nuire à la radio-opacité. De nombreux stents sont actuellement disponibles dans cet alliage de plus en plus utilisé, qui a également montré une résistance à la corrosion au moins aussi efficace que l'acier inoxydable [62].

Fig. 9 : Stent de seconde génération en cobalt-chrome.



2.3.2. REPONSE PHYSIOLOGIQUE A L'IMPLANTATION D'UN STENT

La cinétique de réparation physiologique de la paroi vasculaire après implantation d'un stent chez l'Homme est actuellement bien caractérisée grâce à des séries autopsiques. Durant la phase précoce (<30 jours), on constate un léger thrombus intra-luminal avec un infiltrat de cellules inflammatoires telles que les macrophages et les leucocytes. Les agrégats plaquettaires et les dépôts de fibrine sont constatés jusqu'à 30 jours. Les lymphocytes T infiltrent la paroi entre la 2^{ème} et la 4^{ème} semaine et y persistent jusqu'à 6 mois. Durant la même période, les cellules musculaires lisses ainsi que la matrice extra cellulaire (formée de collagène de type III et de protéoglycanes) commencent à former la néointima. La ré-endothélialisation complète du stent est achevée 3 à 4 mois après son implantation. L'épaisseur maximale de néointima est constatée 6 à 12 mois après l'implantation du stent, puis elle se réduit progressivement jusqu'à 3 ans après l'implantation, le collagène III étant remplacé par du collagène I [63]. A partir de 4 ans, une nouvelle période de ré-épaississement de la néointima semble survenir [64].

Cette cicatrisation de la paroi artérielle après l'implantation d'un stent est physiologique et nécessaire, car elle permet le recouvrement et la ré-endothélialisation des mailles du stent, afin de prévenir leur thrombogénicité et de restaurer la fonction anticoagulante et anti-inflammatoire de l'endothélium. Toutefois, lorsque cette réaction est excessive, elle entraîne une resténose de la lumière artérielle. Si la cicatrisation physiologique de la paroi vasculaire après implantation d'un stent nu est bien caractérisée, l'ampleur de cette réaction dépend de nombreux facteurs.

2.3.3. RESTÉNOSE INTRA STENT

La resténose intra stent est une réaction de cicatrisation excessive de la paroi vasculaire en réponse à l'implantation du stent, caractérisée par une hyperplasie de la néointima responsable d'un rétrécissement de la lumière artérielle [65]. Elle est classiquement définie comme une réduction de plus de 50% en diamètre de la lumière artérielle à distance de l'implantation d'un stent. Le taux de resténose après implantation d'un stent nu atteint 20 à 30% à 6 mois en pathologie coronarienne [66] et jusqu'à 50% au niveau des axes de jambe [67]. La resténose entraîne une récurrence des symptômes nécessitant le plus souvent une ré-intervention, soit de nouveau par voie endovasculaire soit par chirurgie conventionnelle.

Les différents résultats publiés sur la perméabilité des artères coronaires et des artères infra-poplitées, pour un diamètre équivalent, peuvent s'expliquer de plusieurs façons. Les lésions périphériques (infra-poplitées) sont souvent plus longues et plus complexes ; la composition de la plaque d'athérome est différente ; le débit moyen et les contraintes de cisaillement sont réduits ; il existe des périodes relativement longues de stase sanguine durant le cycle cardiaque ; il existe des différences phénotypique dans l'hyperplasie néo-intimale et le remodelage et une augmentation du potentiel thrombogène [68].

Les facteurs cliniques et angiographiques prédictifs de resténose intra stent sont :

- les lésions longues [69]
- le stenting d'artère de petit diamètre (moins de 3 mm et d'autant plus que le diamètre est inférieur à 2,5 mm) [70]
- l'utilisation de plusieurs stents (lésions de plus de 15 mm et implantation d'au moins 2 stents avec un chevauchement) et la longueur du stent [71]
- un petit diamètre minimum intra-stent [72]
- l'implantation du stent chez un patient diabétique [73] et tout spécialement chez un diabétique insulino-requérant [74]

Les mécanismes impliqués dans cette réaction de cicatrisation excessive de la paroi ont été largement étudiés chez l'homme par des séries autopsiques et dans des modèles animaux.

Brièvement, ces mécanismes peuvent être divisés en deux phases : une phase précoce suivant immédiatement le traumatisme physique du stent sur la paroi, entraînant une réaction inflammatoire locale, puis systémique, ainsi qu'une agrégation et une activation plaquettaire. Le relargage de nombreux facteurs de croissance entraîne à la phase tardive une dédifférenciation des cellules musculaires lisses qui vont proliférer et migrer vers la néointima, puis sécréter la matrice extracellulaire, ayant pour conséquence une hyperplasie néointimale et une resténose.

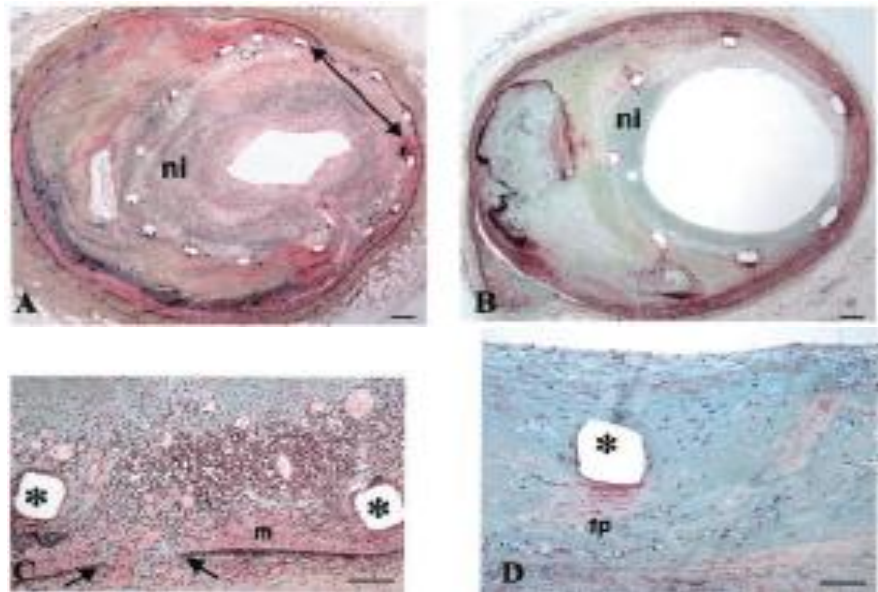
2.3.3.1. FACTEURS MECANIQUES IMPLIQUES DANS LA RESTENOSE INTRA STENT

La mise en place du stent entraîne une dénudation de l'endothélium, un étirement voir une rupture de la limitante élastique interne et de la média, un écrasement de la plaque d'athérome et une augmentation de la lumière artérielle par la force radiale du stent sur la paroi [75]. Ces altérations physiques de la paroi vasculaire sont corrélées à l'ampleur de la réponse cellulaire complexe pouvant aboutir à l'hyperplasie néointimale et à la resténose.

Chez l'homme, une analyse histologique a clairement démontré que la présence d'une effraction de la média et la longueur de cette effraction sont associés à une majoration de l'hyperplasie néointimale, ainsi qu'à une majoration de la réaction inflammatoire néointimale. De plus, il a été démontré que le déploiement du stent sur une plaque riche en lipide (noyau lipidique occupant plus de 30% de l'air de la plaque) favorise une rupture de la chape fibreuse par la maille du stent, elle-même favorisant une majoration de l'hyperplasie et de l'inflammation myointimale (Fig.10) [65].

Ce phénomène est également démontré dans un modèle de resténose chez le rat, où une rupture de la média, constatée dans 40% des cas, conduit à une prolifération des cellules musculaires lisses, alors que lorsque la limitante élastique interne est intact, l'hyperplasie intimale est minime [76, 77].

Fig. 10 : Majoration de l'hyperplasie néointimale lors de la présence d'une effraction de la média (A, flèches) comparativement à l'intégrité de la limitante élastique interne (B). La rupture de la média entraîne une majoration de l'inflammation de la néointima (C) comparativement au maintien de l'intégrité de la média (D) selon Farb *et al.* [65].



2.3.3.2. LA PHASE PRÉCOCE

Dans les minutes qui suivent l'implantation du stent, un recrutement et une invasion des leucocytes (macrophages et lymphocytes T principalement) associés à une déposition massive de plaquettes activées sont observés au niveau de la paroi artérielle lésée. L'endothélium lésé va exprimer en surface le facteur von Willebrand et la P-selectine qui provoquent la dégranulation et l'activation plaquettaire, puis leur agrégation par interaction avec les récepteurs plaquettaires platelet P-selectin glycoprotein (GP) ligand-1 et integrin GPIb/IX/V. Les plaquettes activées sécurisent ensuite leur ancrage à l'endothélium lésé par l'interaction entre leurs glycoprotéines GP IIbIIIa et $\alpha 5\beta 1$, et la fibronectine sous endothéliale [78].

Dans cet environnement pro-inflammatoire, les neutrophiles et plaquettes activés, en association avec les cellules endothéliales lésées, vont être responsables d'une augmentation significative de l'expression de ligands en surface cellulaire. Les plaquettes activent leurs récepteurs au fibrinogène et les neutrophiles augmentent l'expression de leurs molécules d'adhésion de surface. Les plaquettes adhérentes à l'endothélium vont favoriser l'adhésion de cellules inflammatoires comme les monocytes, en relarguant ou en exprimant de nombreuses molécules pro-

inflammatoires telles que : platelet factor 4, macrophage inflammatory protein 1, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES), CD40 ligand, IL-1, TGF et P-selectine [79]. Les cellules endothéliales endommagées et les leucocytes vont également relarguer de puissants chemoattractant, tels que le TNF, IL-1, et l'IL-6 [80].

Ce syndrome inflammatoire local provoque ensuite une réaction inflammatoire systémique, les cellules endothéliales lésées provoquant la sécrétion de facteur tel que la C réactive protéine (CRP), qui elle-même majore la réponse inflammatoire locale. Ainsi, le risque de resténose est corrélé à l'ampleur et à la persistance de l'inflammation locale et systémique [80].

Les plaquettes produisent également de nombreux facteurs de croissance tels que le PDGF, le TGF- β et le basic fibroblast growth factor (bFGF), qui vont contribuer à la prolifération et à la migration des cellules musculaires lisses vasculaires [81]. Le PDGF est relargué par les plaquettes, mais également par les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales ou les macrophages du site d'effraction de la paroi artérielle [82].

2.3.3.3.LA PHASE TARDIVE

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont une population hétérogène. Leur phénotype différencié possède des propriétés contractiles et une faible fréquence de prolifération. Ce phénotype est contrôlé par l'héparine et le TGF- β . Le phénotype indifférencié a une forte activité de synthèse de protéines, de prolifération et de migration. Le passage d'un phénotype différencié à un phénotype indifférencié est induit par le bFGF et le PDGF. Le phénotype myofibroblastique est supposé être un marqueur des réactions pathologiques comme la resténose. Il exprime plusieurs marqueurs de cellules musculaires lisses différenciées mais possède également une forte capacité de prolifération, de migration et de production de matrice extracellulaire, de cytokines et de chemokines [13, 83, 84].

La multiplication des cellules musculaires lisses vasculaires est influencée par les facteurs de croissance, les forces mécaniques, le stress oxydatif et le système rénine-angiotensine (Ras). Les facteurs de croissance jouent un rôle crucial dans le développement de la resténose et comprennent principalement le PDGF, l'epidermal growth factor (EGF), le FGF et l'IGF-1.

En l'absence de stimulation, deux cascades principales sont impliquées dans la régulation du phénotype des cellules musculaires lisses [81]:

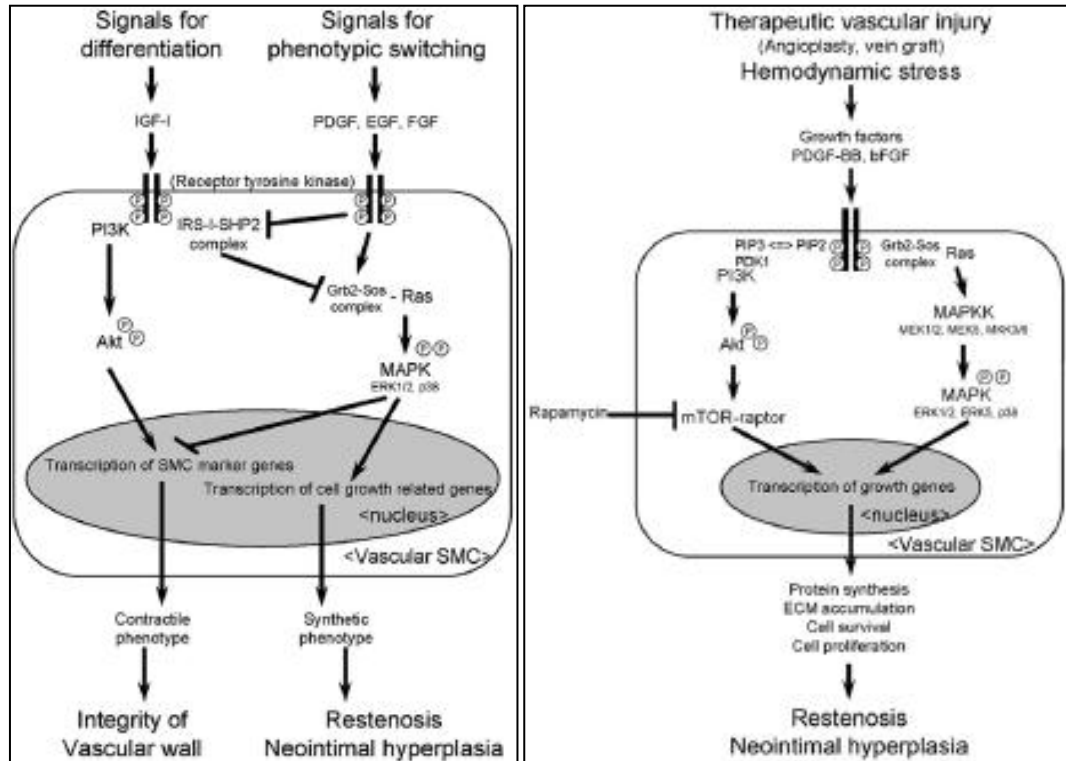
- L'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induit l'expression de gènes associés au phénotype contractile différencié des cellules musculaires lisses, la cascade de signalisation impliquant le phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et la protéine kinase B (Akt). En même temps, IGF-1 inhibe la cascade des Ras et mitogen-activated protein kinase (MAPK) par le complexe insulin receptor substrate-I (IRS-I) et Src homology protein 2 (SH2).
- Le changement vers le phénotype indifférencié prolifératif s'effectue lors de la stimulation de la cellule par plusieurs facteurs de croissance, dont le PDGF, l'EGF et le FGF. Ces facteurs de croissance stimulent directement les MAPK et clivent le complexe IRS-I/SH2. La transposition des MAPK dans le noyau inhibe la transcription des gènes associés au phénotype contractile et stimulent l'expression des gènes associés à la prolifération.

Lors de l'effraction de la média par l'implantation du stent, ces deux cascades de signalisation convergent et entraînent un changement de phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires, de leur prolifération, de leur migration et de la synthèse de matrice extra cellulaire, aboutissant à l'hyperplasie néointimale (Fig. 11) [81] :

- L'altération de la paroi vasculaire entraîne la sécrétion de facteurs de croissance (PDGF, angiotensin-II et TGF- β) pro-mitogéniques et chemoattractants pour les cellules musculaires lisses vasculaires.
- Ces facteurs stimulent les deux cascades de signalisation responsables de la prolifération : Ras-MAPK et PI3K-Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR).
- Ils stimulent également les protéines G monomériques de la famille des Rho kinases, Cdc42, Rac et Rho, responsables de la migration cellulaire via le contrôle de l'architecture du cytosquelette intracellulaire. La stimulation des rho-kinases induit la reconstruction des filaments d'actine et la migration des cellules.
- Les facteurs de croissance peuvent contrôler la stabilité de la matrice extracellulaire en modifiant la synthèse et la sécrétion de ses composants par les cellules musculaires lisses. L'accumulation de matrice extracellulaire est liée à un déséquilibre de la balance synthèse (régulée par les MMP) / dégradation (régulée par les inhibiteurs des MMP).

- Enfin, les facteurs de stress hémodynamique lors du traumatisme vasculaire activent les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose, conduisant à une cicatrisation normale de la paroi en cas d'augmentation d'apoptose, ou à la resténose en cas de réduction de l'apoptose des cellules musculaires lisses.

Fig. 11 : Cascades de signalisation impliquées dans le changement de phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires d'après Muto *et al.* [81].



2.3.4. ANALYSE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DE LA RESTENOSE INTRA-STENT DURANT LA PHASE TARDIVE.

Lors de la stimulation par les facteurs de croissance, les cellules musculaires lisses quiescentes entrent en phase G1.

La régulation de la progression en phase G1 et la transition G1/S est régulée par les cyclin-dependent kinases (cdks) et leurs inhibiteurs (cdki) [85]. Les cyclines D et E, synthétisées durant la phase G1, lient respectivement les cdk4 et cdk2 pour médier la transition G1/S [86]. La protéine rétinoblastique (Rb), lorsqu'elle est phosphorylée par les cdk 4/6, se dissocie du facteur

de transcription adénoviral E2-motif-binding, ce qui lui permet d'initier la transcription génomique et la réplication de l'ADN [87, 88]. Les cdkis sont d'importants régulateurs négatifs de ces interactions. La cdk_i p21 inhibe l'activité des cdk4/6 et la cdk_i p27 inhibe celle de cdk2, empêchant l'entrée de la cellule en phase S [89]. La transition G2/M nécessite une interaction entre la cellule division cycle 2 kinase (cdc2) et la cycline B pour former le « facteur promoteur de la mitose ».

Les cascades de signalisation ERK1/2 et PI3K/Akt sont impliquées dans la régulation des transitions G1/S et G2/M [90]. La cascade PI3K/Akt régule à la baisse la transition G1/S en stabilisant les cyclines D1 et c-myc et en augmentant la stabilité de p27 [91]. ERK1/2 est le régulateur le plus important de l'augmentation de la transition G1/S [92], qui agit en supprimant l'expression de p27^{Kip} [93, 94] et en induisant l'augmentation du neuron-derived orphan receptor-1 des cellules musculaires lisses, récepteur nécessaire à l'expression des cyclines D1 et à la progression du cycle cellulaire [95]. ERK1/2 semble également réguler la transition G2/M [90].

Au contraire, p38 MAPK, activée lors d'un stress cellulaire, a des effets anti-prolifératifs sur les cellules musculaires lisses [90, 96]. P38 MAPK interagit avec p27^{Kip} pour augmenter son expression et participe avec JNK à l'arrêt de la croissance cellulaire et à l'apoptose [97].

Le PDGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses par le contrôle du cycle cellulaire et la synthèse de protéines. Le PDGF active les 2 cascades de prolifération cellulaire en phosphorylant Akt et ERK1/2 [90]. Cela induit la transition G1/S par l'activation de cdk2 et Rb, l'expression des cyclines D et la diminution d'expression de p27^{Kip1} [90, 98].

En plus de stimuler la prolifération des cellules musculaires lisses, le PDGF est le chemoattractant le plus puissant des cellules musculaires lisses [99]. Cette migration induite par le PDGF est dépendante des protéines G monomériques de la famille Rho telles que : Rac1, cdc2 et RhoA [100] et passe par l'activation de la cofiline, qui est responsable en partie du rapide renouvellement des filaments d'actine nécessaire à la migration [101].

Afin de réduire ce phénomène de resténose par cicatrisation excessive de la paroi, des stents actifs libérant une substance anti-proliférative ont été développés.

2.4. LES STENTS ACTIFS

Afin de réduire la resténose intra stent, l'implantation de stents couverts de poly-tetra-fluoro-éthylène a été testée mais n'a pas montré de bénéfice sur la resténose voire même conduire à un possible excès de thrombose [102, 103].

Dès lors, les recherches se sont tournées vers l'inhibition de mécanismes cellulaires spécifiquement impliqués dans la resténose intra stent. L'administration par voie systémique de ces substances s'est révélée inefficace [104], mais l'administration locale d'agents antiprolifératifs a montré une réduction de formation de néointima chez l'animal [56]. Dès lors, les stents actifs ont rapidement révolutionné la prise en charge de la pathologie coronarienne et sont devenus le traitement de référence. Toutefois, le risque de thrombose aiguë tardive après implantation de ces stents est une préoccupation majeure depuis leur utilisation massive.

Ces stents actifs expansibles sur ballon et de petit diamètre ont été conçus en premier lieu pour la pathologie coronarienne, mais commencent à être étudiés en pathologie athéromateuse infra-poplitée.

2.4.1. GÉNÉRALITÉS

Les stents actifs sont composés de 3 parties : le stent, le polymère et la drogue, caractérisée par sa cinétique de relargage.

Les deux premiers stents actifs autorisés par la Food and Drug Administration (FDA, États-Unis) sont le stent Cypher™ (Cordis Corporation, Miami, FL) en avril 2003, libérant du sirolimus (ou rapamycine), et le stent TAXUS™ (Boston Scientific, Natick, MA, USA), en mars 2004, libérant du paclitaxel.

Le stent utilisé comme plateforme pour ces deux stents actifs est un stent en acier inoxydable dont les mailles font 130 à 140 μm d'épaisseur.

Les polymères utilisés pour le coating de ces deux stents sont des polymères non érodables. Le stent Cypher utilise le polyéthylène-co-vinyl (PEVAC) et le poly n-butyl methacrylate (PBMA). Si le PEVAC est autorisé pour délivrer des drogues, son utilisation au contact du flux sanguin n'est pas documentée. Le PBMA est utilisé pour l'application de drogues cutanées, mais n'est pas non plus documenté pour une implantation intraluminale. De plus, tous deux sont associés à des réactions d'hypersensibilité chez l'homme. Le stent Taxus utilise le polymère poly(styrene-b-isobutylène-b-styrene). Ce polymère est bien connu mais n'a jamais été implanté chez l'homme auparavant, ni été testé au contact du sang [105].

Le sirolimus (ou rapamycine) est un agent immunosuppresseur qui inhibe la progression du cycle cellulaire à un stade précoce, entraînant la cellule dans un état quiescent (Fig. 12). Il agit par inhibition de la mTOR, ce qui permet une réduction de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses, ainsi qu'une plus forte expression du phénotype contractile et une réduction de synthèse de collagène [12]. En effet, la cascade de signalisation de mTOR régule l'initiation de la translation, dont les signaux effecteurs empruntent la voie de l'Akt et de la PI3K. Cette cascade contrôle la différenciation des cellules musculaires lisses, la synthèse des protéines, la taille des cellules et leur prolifération.

Le paclitaxel, est un agent stabilisateur des microtubules qui inhibe la progression du cycle cellulaire à un stade tardif, entraînant l'apoptose cellulaire (Fig. 12).

- Ces stents actifs ont été testés chez l'animal (principalement pour le stent Cypher) puis chez l'Homme, démontrant leur efficacité dans la réduction de la resténose intra stent avec 26,6% et 7,9% de resténose, respectivement à 9 mois pour le stent nu et le stent Taxus [106], et 21,3% et 5,8% à 2 ans, respectivement pour le stent nu et le stent Cypher [107].

Des stents de deuxième génération sont actuellement commercialisés. Ce sont les stents Endeavor (zotarolimus) et Xience V (everolimus).

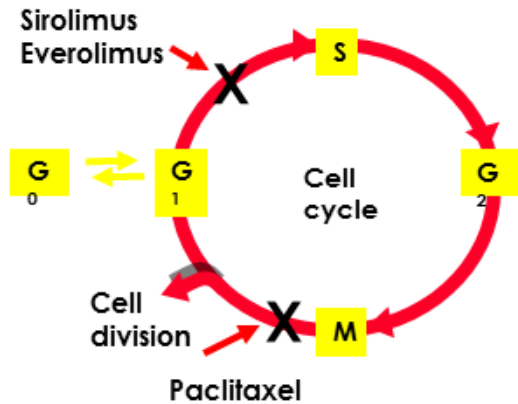


Fig. 12 : Effet du sirolimus et du paclitaxel sur le cycle cellulaire.

Tous deux libèrent des analogues du sirolimus, mais en quantité moindre et avec une vitesse de relargage plus rapide. Ces stents actifs de deuxième génération utilisent un stent plateforme en Chrome-cobalt, dont les mailles font environ 80-90 μm d'épaisseur. Il est montré que ces mailles plus fines permettent une meilleure ré-endothélialisation. Les polymères utilisés sont toujours des polymères non érodables mais de meilleure qualité, et gardent une meilleure intégrité après déploiement du stent, comparativement au stent Cypher, permettant une réduction de l'inflammation. Ces stents actifs ont également montré une réduction de la resténose après leur utilisation, comparativement aux stents nus [108, 109]. Toutefois, à 14 jours de l'implantation, la ré-endothélialisation est plus importante sur les stents nus et les stents XienceV que sur les autres stents [110]. Les caractéristiques de ces différents stents sont décrites dans le tableau 1.

2.4.1.LA THROMBOSE AIGUË TARDIVE

L'engouement initial pour les stents actifs a rapidement été contrebalancé par le risque de thrombose aiguë tardive du stent. La thrombose est liée à 2 principales complications : le retard ou le caractère incomplet de la cicatrisation de la paroi vasculaire après implantation du stent et les réactions d'hypersensibilité au polymère. Ainsi, les méta-analyses initialement réalisées n'ont pas mis en évidence de bénéfice lié à l'utilisation des stents actifs, car malgré une réduction des ré-interventions pour resténose, le taux de mortalité et la proportion de thrombose de stent ne sont pas significativement réduits par comparaison aux stents nus [111]. En effet, la thrombose aiguë d'un stent est un évènement plus grave que la resténose car elle aboutit en général à un infarctus

du myocarde dans le territoire qui dépend de cette artère thrombosée, alors que la resténose entraîne une ischémie myocardique chronique qui pourra être prise en charge avant l'infarctus.

	Concentration de drogue	Vitesse de relargage
Cypher (sirolimus)	135µg/13mm	68,4% à 28 jours
Taxus (paclitaxel)	85µg/12mm	10% à 28 jours
XienceV (everolimus)	56µg/12mm	79,5% à 28 jours
Endeavor (zotarolimus)	10µg/mm	95% à 14 jours

Tableau 1 : Caractéristiques des différents stents actifs.

2.4.1.1. **DEFAUT DE CICATRISATION DE LA PAROI VASCULAIRE**

La réduction de l'hyperplasie intimale liée à la libération de la drogue entraîne également un retard de cicatrisation de la paroi vasculaire dont les mécanismes sont encore mal élucidés.

Chez le porc, l'implantation d'un stent actif coronarien entraîne une persistance de la fibrine néointimale, une hémorragie intra intimale et une inflammation intimale et adventitielle, sans altération de la ré-endothélialisation mais avec un dysfonctionnement de l'endothélium [112-114]. Chez le lapin, il a clairement été démontré une ré-endothélialisation retardée et incomplète des stents Cypher et Taxus comparativement aux stents nus, en particulier au niveau des zones de chevauchement [115].

Les séries autopsiques ont permis de caractériser chez l'humain ce retard de cicatrisation de la paroi vasculaire après implantation d'un stent actif, caractérisé par la persistance de fibrine, une épaisseur néointimale minime et une ré-endothélialisation incomplète, comparativement aux stents nus [116].

Les stents actifs sont associés à un dysfonctionnement majeur de la vasomotricité endothéliale par perte de la biodisponibilité du NO et déséquilibre de la balance vasoconstricteurs / vasodilatateurs, mécanisme clef dans le dysfonctionnement de l'endothélium [117]. En effet, ils provoquent une augmentation de la vasoconstriction après leur implantation, ainsi qu'une altération profonde de la vasodilatation endothélium-dépendante et une réduction de la vasodilatation endothélium-indépendante. La vasodilatation dépendante de l'endothélium reste altérée au long cours. Au contraire, l'implantation d'un stent nu conduit à une altération de la réaction vasomotrice de l'endothélium en partie similaire à celle des stents actifs, mais permet dans le temps une récupération complète de cette fonction [118].

La thrombose aiguë de stents actifs semble être multifactorielle et dépendre, d'une part, du retard de cicatrisation (principalement de ré-endothélialisation) après implantation du stent et, d'autre part, des caractéristiques techniques de l'implantation, du terrain et de la prise d'antiagrégants plaquettaires. Ainsi, le thrombus et le corps lipidique de la plaque peuvent influencer le relargage et la distribution de la drogue, et donc les risques de thrombose. La longueur de la lésion traitée, et par conséquent la longueur du stent actif implanté, est également un facteur de thrombose, principalement par un risque de mauvaise apposition du stent contre la paroi, créant des forces de cisaillement anormales [119]. De plus, la plaque sous jacente semble jouer un rôle dans le risque de thrombose aiguë de stent. En effet, la thrombose survient préférentiellement dans les zones de bifurcation, en raison des modifications des flux et forces de cisaillement [120], et lors du traitement de plaques d'athérome compliquées, l'effraction du corps nécrotique par le stent entraînant une exposition des lipides fortement thrombogéniques au sang circulant [121]. Enfin, l'arrêt intempestif des antiagrégants plaquettaires est également associé au risque de thrombose aigu, ce qui se conçoit aisément compte tenu du retard de cicatrisation [122].

2.4.1.2. RÉACTIONS D'HYPERSENSIBILITÉ AU POLYMÈRE

En plus du retard de cicatrisation, des réactions d'hypersensibilité au polymère ont été rapportées avec l'utilisation des stents actifs. Cette réaction est caractérisée par une réaction inflammatoire locale, avec infiltration d'éosinophiles, de lymphocytes et de cellules géantes multinuclées, qui entraîne un remodelage positif du vaisseau, une mauvaise apposition et finalement une thrombose

du stent [123]. Cette réaction est décrite un an après l'implantation du stent. Elle est donc attribuée au polymère libérant la drogue, la drogue elle-même étant alors totalement relarguée.

Ces cas d'hypersensibilité localisée au polymère sont décrits avec le stent Cypher. Les symptômes sont variables, allant d'une réaction bénigne à une réaction inflammatoire excessive avec infiltrats d'éosinophiles et de cellules géantes, associée à une destruction de la média, à une mauvaise apposition du stent et à la formation d'un anévrisme, responsable à terme d'une occlusion du stent [124].

Par ailleurs, une étude en microscopie électronique de stents actifs déployés à 37°C dans une solution saline a montré en surface des stents, plusieurs types défauts dans la couche de polymère, associés à des risques potentiels de thrombose, de micro-embolies coronariens ou de réaction inflammatoire (Fig. 13) [125].

2.4.1.1. CONCLUSION SUR L'UTILISATION ACTUELLE DES STENTS ACTIFS

Les stents actifs de première génération ont permis une réduction importante de la resténose après revascularisation par stenting coronarien. Néanmoins, ils sont associés à un risque de thrombose aiguë tardive largement documenté et n'ont pas montré de bénéfice sur la survie cumulée ou la récurrence du syndrome coronarien [126].

Les stents actifs de seconde génération possèdent des polymères biocompatibles, des drogues différentes et un nouveau stent plateforme (cobalt chrome) ayant des mailles plus fines. Ils semblent donner de meilleurs résultats que la première génération, particulièrement le stent everolimus [127], mais les résultats précoces favorables doivent être confirmés sur des cohortes plus importantes.

Initialement développé pour la pathologie coronarienne, les stents actifs ont plus récemment été étudiés dans le traitement endovasculaire infra-poplité de l'ischémie critique. Les résultats des études et méta-analyses semblent retrouver un bénéfice sur la perméabilité primaire, avec réduction du nombre de ré-intervention. Toutefois, aucune étude à notre connaissance n'a montré

de bénéfice clinique à l'utilisation des stents actifs, sur le taux d'amputation ou le taux de mortalité [128, 129].

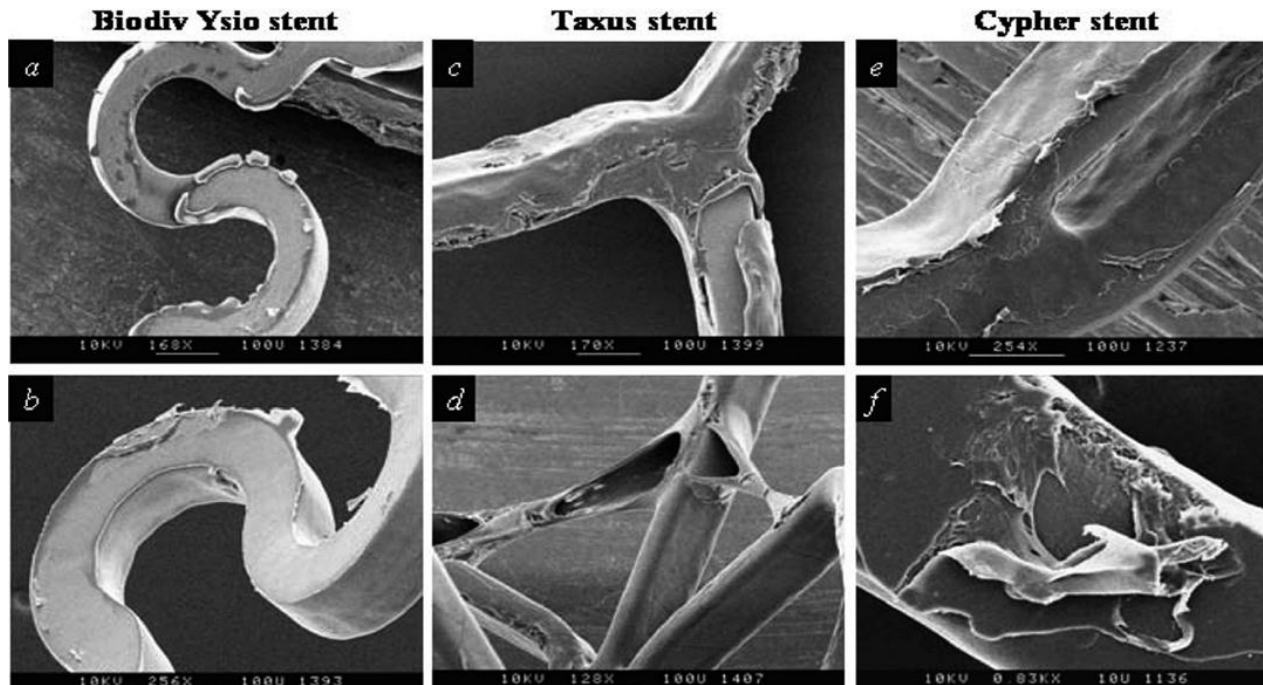


Fig. 13 : Fissuration de polymère étudié en microscopie électronique à balayage après déploiement de stent actif en milieu salin à 37°C selon Otsuka *et al.* [125].

2.5. TRAITEMENT ANTIAGRÉGANT PLAQUETTAIRE

Le traitement antiagrégant plaquettaire, suite à l'implantation d'un stent nu ou actif, est donc primordial jusqu'à la cicatrisation et particulièrement la ré-endothélialisation complète des mailles du stent. L'arrêt des antiagrégants durant le mois suivant l'implantation d'un stent coronarien est associé à un risque accru d'infarctus du myocarde, de décès et de thrombose de stent. L'interruption précoce du traitement par clopidogrel est actuellement le principal facteur prédictif de thrombose de stent [122, 130].

Toutefois, une double thérapie antiagrégante plaquettaire comporte des risques hémorragiques, ayant pour conséquence une augmentation des séjours hospitaliers et une augmentation de la mortalité. De plus, ce traitement peut poser problème lors de la réalisation d'actes chirurgicaux et lorsque le patient nécessite déjà une anticoagulation par anti-vitamine K.

Les sociétés Européennes et Nord Américaines recommandent actuellement d'administrer une double thérapie antiagrégante par acide acétylsalicylique (aspirine) et clopidogrel, durant au moins 4 semaines après l'implantation d'un stent nu coronarien, et, si le patient n'est pas à risque hémorragique, durant 12 mois. En ce qui concerne les stents actifs, suite aux nombreuses publications sur les retards de cicatrisation, les mauvaises appositions tardives et les thromboses aiguës très tardives de ces stents, les recommandations sont d'administrer une double thérapie antiagrégante aspirine et clopidogrel durant un minimum de 12 mois. Au-delà de 12 mois, la poursuite de la bithérapie doit être envisagée [131].

2.6. ACTUALITE DE LA RECHERCHE SUR LES NOUVEAUX STENTS ACTIFS

En plus des améliorations apportées par les stents actifs de seconde génération, les travaux de recherche se poursuivent activement pour développer de nouvelles approches, en particulier par l'utilisation de polymère et/ou de stents biodégradables, par l'administration locale de drogue sans utilisation de polymère ou par la recherche de nouvelles drogues pro-cicatrisantes à délivrer localement.

Ce chapitre ne peut pas être exhaustif. Il présente les principaux axes de recherches ayant abouti à des essais cliniques et présentant un intérêt pour le travail de thèse détaillé ensuite.

2.6.1. POLYMERES BIO-RESORBABLES, STENTS BIO-RESORBABLES ET STENTS ACTIFS SANS POLYMERES

La persistance d'un polymère non résorbable au contact de la paroi vasculaire, longtemps après le relargage complet de la drogue, est responsable d'une inflammation locale et d'un retard de cicatrisation, pouvant entraîner la thrombose du stent. C'est pourquoi des travaux de recherche se sont orientés vers une administration locale de drogue par un polymère biodégradable et, par extension de ce concept, à des stents actifs totalement exempts de polymère ou des stents complètement biodégradables [60].

Des stents actifs à polymère biodégradables sont actuellement développés. Toutefois, l'amélioration clinique des résultats par l'implantation de ces nouveaux stents reste encore

hypothétique. En effet, si les résultats précoces sont encourageants, les résultats à plus long terme ne sont pas connus. Ces polymères biodégradables sont associés à une réaction inflammatoire importante, pouvant parfois créer un environnement acide. De plus, une réponse immunitaire persistante peut également survenir lors de la dégradation des monomères [60].

Les stents actifs sans polymère ont l'avantage d'éviter la présence prolongée d'un polymère, d'améliorer la cicatrisation, d'améliorer la surface du stent et de réduire la durée de la thérapie anti-thrombotique associée.

L'administration de la drogue sans polymère peut s'obtenir de différentes façons :

- par dissolution de la drogue dans un support biodégradable non polymérique ;
- par imprégnation de la drogue directement sur la surface d'un stent poreux. Ce procédé correspond au seul stent sans polymère actuellement disponible en Europe (le YUKON DES, Translumina, Hechingen, Allemagne). Il semble sur des résultats à 3 mois que la porosité du stent favorise la ré-endothélialisation ;
- par fixation de la drogue directement en utilisant soit une liaison covalente, soit un procédé de cristallisation / précipitation chimique [60].

Les stents actifs totalement biorésorbables présentent différents avantages théoriques comparativement aux deux types de stent précédents. Leur principe est d'apporter la drogue et le support mécanique du stent jusqu'à la cicatrisation de la paroi vasculaire, puis de se résorber totalement afin d'éviter les risques de thrombose et de réduire la durée du traitement antiagrégant plaquettaire. Physiologiquement, l'absence de rigidité métallique doit permettre de favoriser de nouveau la vasomotricité de la paroi vasculaire et de réduire les contraintes de cisaillement, l'élargissement de la paroi et le remodelage tardif. D'autres avantages théoriques sont la possibilité d'une revascularisation chirurgicale dans la zone d'implantation du stent, la possibilité de couvrir des branches collatérales et l'amélioration de l'analyse par imagerie (ARM ou angio-TDM). Le polymère le plus utilisé pour ces stents est le PLLA, qui est métabolisé par l'intermédiaire du cycle de Krebs en 12 à 18 mois, en petites particules inertes de dioxyde de carbone et en eau, qui sont ensuite phagocytées par des macrophages. Toutefois, ces stents présentent des limitations majeures qui font qu'aucun n'est actuellement autorisé en pratique

clinique en Europe ou en Amérique du nord. Ces limitations sont leur caractère non radio-opaque nécessitant l'ajout de marqueurs, leur manque de force radiale nécessitant des mailles épaisses et leur inaptitude à se déformer [60].

2.6.2. STENTS PRO-CICATRISANTS

Le principe des stents « pro-cicatrisants » consiste en une ré-endothélialisation accélérée des mailles du stent et une restauration rapide de la fonction de l'endothélium, afin de limiter les risques de thrombose aiguë tardive. Deux principes sont à l'étude : une endothélialisation *in vitro* des mailles avant l'implantation du stent ; et une endothélialisation *in vivo* basée sur la mobilisation des progéniteurs endothéliaux circulants.

Les cellules testées pour l'endothélialisation *in vitro* comprennent les cellules endothéliales, les progéniteurs endothéliaux circulants, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules souches embryonnaires et les cellules souches pluripotentes induites :

- l'endothélialisation par des cellules endothéliales matures pose de nombreux problèmes techniques (modifications phénotypiques après plusieurs passages, capacité limitée de prolifération, isolement difficile) [132] et la thérapie génique par le VEGF semble plus prometteuse [133] ;
- l'isolement de progéniteurs endothéliaux chez le porc, leur culture et leur différenciation *in vitro* en cellules endothéliales matures, ont permis de reproduire une fonction endothéliale similaire à l'endothélium aortique natif [134] ;
- le caractère pluripotent des cellules souches mésenchymateuses, maintenu en culture, a permis de montrer chez le lapin, une réduction d'hyperplasie néointimale et une majoration de ré-endothélialisation. Le stent étaitensemencé avec des cellules souches mésenchymateuses prélevées auparavant chez le même lapin [135] ;
- les cellules souches embryonnaires ont démontré leur capacité à faciliter la revascularisation d'implants, mais de multiples difficultés font obstacle à leur utilisation sur des stents : difficultés à les différencier, à les isoler et à les cultiver *in vitro*, auxquelles s'ajoutent les controverses d'ordre éthique et les réactions immunitaires [136] ;

- les cellules souches pluripotentes induites sont une nouvelle population de cellules souches, induites à partir de cellules somatiques adultes par reprogrammation de la transduction des facteurs de transcription. Diverses cellules cardiovasculaires peuvent être induites *in vitro*, comme les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. Cette méthode est plus simple et ne comporte pas de risques de rejet immunitaire, mais est encore mal maîtrisée puisqu'actuellement, seule une petite proportion de cellules retrouvent leur caractère pluripotent [137].

Même si ces techniques se sont rapidement développées, de nombreux problèmes limitent leur application : elles sont difficiles et coûteuses à mettre en œuvre, les durées prolongées de culture majorent les risques d'infection et les cellules sont difficiles à acquérir et à cultiver en temps opportun [138].

En ce qui concerne la ré-endothélialisation *in vivo* par imprégnation d'un stent avec une drogue procicatrisante, plusieurs nouvelles drogues et nouveaux stents ont été testés ; nous ne parlerons ici que de ceux évalués chez l'Homme :

- le Genous Bio-engineered R-stent (OrbusNeich, Fort Lauderdale, Florida) est recouvert d'anticorps CD34 immobilisés. Ces anticorps ont démontré dans des études précliniques, la propriété de lier les progéniteurs endothéliaux circulants, permettant une ré-endothélialisation rapide et fonctionnelle des mailles du stent. Malheureusement ces anticorps ne sont pas spécifiques et peuvent séquestrer également d'autres progéniteurs circulants tels que ceux des cellules musculaires lisses, aboutissant à une prolifération néo-intimale, ce qui est confirmé par les études cliniques [139] ;
- le stent Catania (CeloNova BioSciences, Newnan, Georgia) est un stent en cobalt chrome à cellules ouvertes, dont la surface est imprégnée d'une fine couche de polymère Polyzene-F. Le Polyzene F est biocompatible et possède des propriétés anti-inflammatoires, bactériorésistantes et pro-cicatrisantes. De plus, ce revêtement limite la thrombogénicité du stent. L'étude ATLANTA (Assessment of The LATEST Non-Thrombogenic Angioplasty stent) -II montre à 12 mois chez 300 patients 8,8% de complications cardiaques majeures et 0,7% de thromboses subaiguës de stent sans thrombose tardive [140] ;

- le stent Titan-2 (Hexacath, Rueil-Malmaison, France) est imprégné de titane-NO, qui a pour propriété d'inhiber l'agrégation plaquettaire, de minimiser les dépôts de fibrine, de réduire l'inflammation et d'être pro-cicatrisant. L'étude TiNOX a comparé les stents Titan-2 aux stents nus sur 92 patients. Les résultats montrent à 6 mois une réduction de l'épaisseur de la néointima par les stents Titan-2, associée à une réduction des complications cardiaques et des revascularisations itératives [141].

2.6.3. STENTS IMPRÉGNÉS D'ANTICOAGULANTS OU D'ANTIAGRÉGANTS

Les stents imprégnés d'héparine ont montré une réduction de leur thrombogénicité dans des modèles précliniques, sans influencer l'hyperplasie neointimale dans certaines études [142, 143], ou associée à des propriétés anti-prolifératives dans d'autres études [144, 145]. L'étude clinique HOPE a démontré qu'après l'implantation du stent HEPACOAT imprégné d'héparine, un traitement par aspirine seule après la procédure est possible, avec un taux de thrombose de stent de 1% à 30 jours, comparable à celui après administration d'une double antiagrégation [146]. Toutefois, une étude sur la réduction de la thrombose des petites artères par l'implantation d'un stent revêtu d'héparine fixée n'a pas permis de démontrer son intérêt, le taux de thrombose dans l'étude étant globalement très faible [147].

Les stents imprégnés d'Abciximab (anti-GPIIb/IIIa) ont montré dans une étude clinique randomisée comparant le stent actif abciximab au stent nu sur 96 patients, une réduction de resténose (28% pour les stents nus contre 14% pour les stents à l'Abciximab) et une réduction des évènements cardiaques, sans thrombose aiguë de stent à 1 an [148, 149].

3. LES MODELES D'ETUDE DE LA RESTENOSE INTRA-STENT

La majeure partie des connaissances sur les mécanismes de resténose, de formation néo-intimale et de sa prise en charge, viennent d'une analyse intense des modèles animaux, et dans une moindre mesure des séries autopsiques chez l'humain. Les modèles d'étude *ex-vivo* sont actuellement quasi inexistant.

3.1. LES MODÈLES D'ÉTUDE *IN VIVO*

Les modèles animaux permettent une bonne compréhension des mécanismes impliqués, ainsi que des possibilités thérapeutiques, en raison d'une bonne corrélation entre la réponse animale et celle chez l'Homme. Toutefois, il existe deux différences majeures, qui sont une réponse néo-intimale exagérée et un retard de cicatrisation important chez l'homme comparativement à l'animal.

3.1.1. MODÈLES MURINS

Les modèles murins de resténose ont pour principaux avantages une grande facilité de manipulation et d'hébergement, un faible coût, une quantité importante possible, une bonne reproductibilité et une large gamme de marqueurs moléculaires disponibles pour la compréhension des mécanismes impliqués.

Le modèle de lésion d'artère carotide de rat est le premier modèle décrit et utilisé depuis les années 60. Conçu initialement pour l'étude de l'athérosclérose, il fut secondairement adapté à l'étude de la resténose. Mais c'est actuellement le modèle d'implantation d'un stent dans l'aorte abdominale de rat qui est le modèle murin le plus utilisé, en raison de sa simplicité et d'une plus grande réponse proliférative qu'une implantation au niveau carotidien ou de l'aorte thoracique [150]. Toutefois, ce modèle possède des limites : l'aorte est une artère élastique, qui répond moins fortement aux lésions que les artères musculaires (coronaires ou infra-poplités) ; la dynamique des écoulements et la fonction vasomotrice des artères élastiques murines sont fondamentalement différentes de celles des artères coronaires humaines que nous avons étudiées précédemment, ce qui pose des problèmes pour l'étude des stents actifs car ces facteurs influencent largement la dynamique de relargage de la drogue et la bioabsorption du polymère [151].

Les artères de souris sont extrêmement petites et posent des problèmes techniques. Un modèle d'étude de resténose après lésion de l'endothélium par passage d'un guide ou par électrocoagulation est décrit car la connaissance du génome de la souris peut permettre des progrès dans la compréhension des interactions cellulaires [152]. Son application reste limitée.

3.1.2. MODÈLE CHEZ LE LAPIN

L'implantation d'un stent dans l'aorte ou principalement dans les artères iliaques de lapin est un modèle bien établi pour l'étude de la resténose. Les lapins ont l'avantage d'être encore assez peu coûteux et de taille raisonnable, simples à manipuler.

La proportion et les phases de cicatrisation après implantation du stent dans les artères iliaques de lapin normocholestérolémique sont semblables au modèle d'implantation d'un stent dans les artères coronaires de porc. Les études de libération des stents actifs montrent des résultats comparables entre ces deux modèles, suggérant que la dynamique d'écoulement sanguin dans les artères iliaques de lapin est similaire à celle des artères coronaires de porc. De plus, le lapin a tendance à développer un retard de ré-endothélialisation après une lésion endothéliale, ce qui en fait un bon modèle pour l'évaluation de la ré-endothélialisation et de la fonctionnalité de l'endothélium. Toutefois, les artères iliaques restent des artères élastiques, donc moins susceptibles de développer une réponse pathologique, et ne permettent pas d'évaluer les événements cardiaques [151].

Le lapin offre également la possibilité d'induire par l'alimentation une hypercholestérolémie, qui entraîne des dépôts de lipides et de cholestérol dans le système réticulo-endothélial et augmente l'importance de la resténose.

3.1.3. MODÈLE CHEZ LE PORC

Le stenting d'artères coronaires de porc est le modèle d'étude préclinique le plus reconnu pour l'évaluation des stents et de la resténose. L'anatomie, la physiologie et l'hémodynamique cardiovasculaire du porc ainsi que son système de coagulation sont globalement similaires à l'Homme. Sa taille permet une évaluation du matériel utilisé chez l'Homme et plusieurs stents peuvent être implantés par coronaire, voir superposés. Toutefois comme dans les autres modèles, le degré de resténose est souvent insuffisant pour entraîner un retentissement clinique. De plus, le porc a une susceptibilité particulière à développer une réaction inflammatoire impliquant des éosinophiles en réponse à tout corps étranger. Enfin, la taille et le coût de ces animaux font obstacle à leur utilisation en routine [151].

3.1.4. PROBLÉMATIQUE DES MODÈLES ANIMAUX

La diversité des modèles reflète l'absence d'un modèle d'étude préclinique fiable. Le modèle murin est simple et peu coûteux mais a une valeur prédictive clinique limitée. Les modèles de lapin et de porc sont les plus représentatifs de la réponse de resténose chez l'Homme, mais restent incomplets.

La formation de néointima chez l'Homme est exagérée et atteint son épaisseur maximale entre 6 mois et 1 an après l'implantation du stent alors qu'elle est maximale à 30 jours dans les modèles animaux. Ces différences s'expliquent principalement par l'absence de plaque d'athérome sous jacente dans les modèles animaux, qui peuvent au mieux développer des dépôts de macrophages chargés de lipides dans l'intima, mais sans réelle plaque d'athérome (une chape fibreuse bien développée recouvrant un noyau nécrotique) et qui ne correspondent pas réellement aux lésions cliniquement retrouvées chez l'Homme. Il a été montré que chez l'Homme, au moins 70% du stent est au contact de la plaque d'athérome sous jacente. Par exemple, en cas de maille au contact d'un corps nécrotique ou d'une plaque calcifiée, très peu de cellules musculaires lisses sont présentes et la cicatrisation se fait après migration de cellules provenant d'un autre site, provoquant un retard de cicatrisation. De plus, l'exagération de la réponse de cicatrisation chez l'Homme est dépendante de l'effraction pariétale vasculaire sous jacente, qui reste modérée sur des artères saines de jeunes animaux [153].

La cicatrisation rapide et l'absence de lésions symptomatiques sont donc des notions essentielles pour l'évaluation préclinique des stents, en particulier celle des stents actifs, et l'interprétation des résultats doit s'effectuer selon les limitations de chaque modèle. En revanche ces modèles permettent une bonne évaluation de la toxicité des drogues et polymères. De plus, l'impossibilité de répéter les prélèvements sanguins et tissulaires chez l'animal rendent l'analyse des stents actifs difficile, en particulier en ce qui concerne la distribution de la drogue et l'érosion du polymère. Enfin, l'utilisation de modèles animaux n'est pas sans poser de questions d'ordre éthique.

La poursuite du développement et la caractérisation de nouveaux modèles précliniques appropriés est donc encore nécessaire pour répondre aux exigences de l'évaluation des nouveaux stents.

3.2. MODÈLES D'ÉTUDE *EX VIVO*

Il existe actuellement très peu de modèles d'étude *ex vivo* de la resténose. Outre les études autopsiques chez l'Homme, seul un modèle d'étude *in vitro* statique de la resténose est décrit. Il s'agit de prélèvements d'artères mammaires internes chez des patients coronariens, qui sont stentées, puis mises en culture durant 28 jours. Les auteurs mettent en évidence la formation d'une hyperplasie néo-intimale, permettant une étude des nouvelles drogues sur la prolifération des cellules musculaires lisses. Toutefois, ce modèle présente de sévères limitations, qui sont l'absence de pression intra artérielle et de contraintes de cisaillement, ainsi que l'absence de cellules sanguines [154].

Ce modèle a très récemment été repris et amélioré, par la transplantation de l'artère humaine stentée chez un rat immunodéficient [155]. Toutefois, ce modèle n'est plus à proprement parlé *ex vivo*.

Des bancs d'essais ont été conçu pour l'analyse des perturbations d'écoulement du flux induit par la mise en place du stent, ou pour l'analyse de la distribution de la drogue dans un tube en silicone [156, 157]. Toutefois, aucun système d'étude *ex vivo* hémodynamique n'est actuellement décrit pour l'étude au long cours de la resténose.

4. CONCLUSION

La recherche scientifique est donc actuellement très active sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la resténose et dans la thrombose des stents, sur l'élaboration de nouveaux stents qui permettrait une réduction de la resténose intra-stent tout en limitant les risques de thrombose, ainsi que sur la description de nouveaux modèles d'études précliniques. Nos travaux de recherche s'inscrivent directement dans cette thématique, portant sur la recherche de nouvelles molécules pro-cicatrisantes ou anti-thrombotiques pouvant avoir un effet bénéfique après implantation d'un stent et, parallèlement, sur la conception d'un nouveau modèle d'étude *ex vivo* hémodynamique de la resténose intra stent.

CHAPITRE 2 :

ETUDE *IN VIVO* DE NOUVELLES MOLECULES THERAPEUTIQUES POUR REDUIRE LA RESTENOSE INTRA-STENT

1. GENERALITES SUR LES MOLECULES ETUDIEES

1.1. L'HEMINE : UN INDUCTEUR ET SUBSTRAT DE L'HEME OXYGENASE 1

L'hème-oxygénase (HO) est l'enzyme du processus de dégradation de l'hème. Elle catalyse le clivage oxydatif de l'hème en monoxyde de carbone (CO), en fer (Fe^{2+}) et en biliverdine, elle-même convertie en bilirubine par la biliverdine réductase [158]. Il en existe trois isoformes chez l'Homme : l'HO-1 qui est une protéine de 32-kDa induite en réponse au stress par différents agents pro-oxydatifs tels que les ROS (reactive oxygen species), l'hème ou l'hémoglobine, les métaux lourds, les radiations UV, les cytokines, les facteurs de croissance (PDGF)... ; l'HO-2 qui est exprimée de façon constitutive et ne répond à aucun stimuli de l'HO-1 ; et l'HO-3 qui est un catalyseur peu actif de l'hème [159].

Le CO endogène, de même que le NO, régule le tonus musculaire de la paroi vasculaire via une augmentation intracellulaire de la cyclic guanine monophosphate (cGMP), toutefois son effet semble moindre [159]. Le CO endogène possède des propriétés anti-inflammatoires par inhibition de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et Macrophage Inflammatory Protein-1 β (MIP-1 β)) et augmentation de la production de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) [160]. Il possède également des propriétés antiprolifératives sur les cellules musculaires lisses vasculaires *via* l'activation de p38 MAPK et l'augmentation de l'expression de p21 [161]. Enfin, il est décrit un effet anti-apoptotique du CO sur les cellules endothéliales par activation de p38 MAPK [162].

La bilirubine et la biliverdine sont des antioxydants. Un taux élevé - dans les limites de la normal - de bilirubine est inversement corrélé au risque athéromateux (y compris de coronaropathie) probablement par inhibition de l'oxydation du LDL cholestérol et neutralisation des radicaux libres. La bilirubine et la biliverdine possèdent également des propriétés anti-prolifératives sur les cellules musculaires lisses vasculaires par inhibition de leur entrée en phase G1 *via* l'inhibition de la voie des MAPK et inhibition de la phosphorylation de la protéine Rb [163].

Le fer ferreux est un donneur d'électrons ayant un potentiel cytotoxique en générant des ros. Il est neutralisé par la ferritine qui le séquestre et permet l'action de la ferroxidase. Ainsi, en augmentant la concentration de ferritine intracellulaire, l'HO-1 réduit les effets cytotoxiques de l'hème et du peroxyde d'hydrogène dans les cellules endothéliales [164].

L'HO-1 et les produits issus de son métabolisme sont des acteurs majeurs de la protection cardiovasculaire en réponse au stress biologique, comme par exemple le stress oxydatif, l'inflammation, l'hypertension artérielle ou l'athérosclérose. Les mécanismes d'actions passent par l'activité antioxydante de la bilirubine, la séquestration du fer par la ferritine, et l'effet vasodilatateur et anti-fibrinolytique du CO.

Des études précliniques ont montré que l'induction de l'activité de l'HO-1 par transfert génétique réduit l'athérosclérose ainsi que la formation de néointima après effraction de l'endothélium sur un modèle d'angioplastie de carotide de rat [165]. L'HO-1 a également un rôle protecteur dans les modèles animaux d'ischémie-reperfusion cardiaque, d'hypertension artérielle pulmonaire et de transplantation. Elle possède un effet anti-inflammatoire dont le mécanisme est mal connu, et des effets anti-apoptotiques via la p38 MAPK et NFK β [159]. L'HO-1 possède également des propriétés pro-angiogéniques. En effet, elle semble agir dans le mécanisme de recrutement des progéniteurs endothéliaux circulant, dont le rôle majeur dans la cicatrisation artérielle et la néovascularisation est largement documenté, via le stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) exprimé sur le site vasculaire lésé [166]. Au contraire l'inhibition de l'HO-1 exacerbe l'athérosclérose entraînant chez des souris déficientes des dépôts de fer au niveau du foie et du rein, des lésions oxydatives macromoléculaires et tissulaires, ainsi qu'une inflammation chronique [167].

Le premier cas de déficit en HO-1 rapporté chez l'Homme a confirmé les caractéristiques retrouvées chez les souris, avec une anémie, des dépôts de fer, une vulnérabilité au stress oxydatif [168]. Des études cliniques ont également montré une relation entre la diminution de l'expression de l'HO-1, liée à une anomalie génétique, et l'augmentation de la resténose intra-stent au niveau coronarien [169, 170] ainsi que des phénomènes thrombo-emboliques veineux des membres inférieurs [171].

L'hémine (Fig. 14) est un inducteur de l'HO-1, utilisé en thérapeutique humaine dans le traitement des porphyries (Normosang®, Orphan Europe). Elle s'administre par voie intraveineuse lente exclusivement et peut avoir des effets hépatotoxiques à forte dose. Plusieurs travaux *in vivo* ont montré un effet cardiovasculaire bénéfique de l'administration d'hémine au long cours. En particulier, des travaux réalisés dans notre laboratoire ont montré qu'un traitement chronique par hémine permet : de réduire la thrombose vasculaire dans un modèle de thrombose carotidienne chez le rat [172] ; de modérer l'évolution de l'insuffisance rénale chronique et de réduire l'hypertension artérielle ainsi que la protéinurie chez le rat nephrectomisé [173] ; et d'améliorer la compliance vasculaire chez des rats spontanément hypertendus [174]. D'autres travaux ont également montré un rôle bénéfique de l'hémine sur la dysfonction endothéliale en cas d'insulino-résistance [175], son effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses [176], et ont souligné son rôle anti-inflammatoire [177].

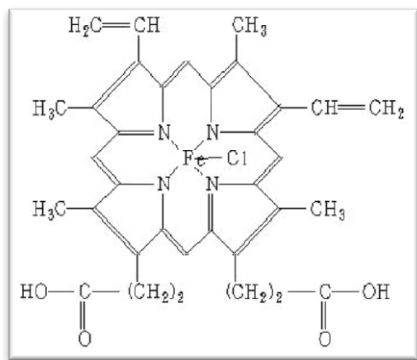


Fig. 14 : Structure chimique de l'hémine (C₃₄H₃₂ClFeN₄O₄) ; masse molaire : 651,96 g/mol ; N° CAS : 16009-13-5.

1.2.EP224283 : UN NOUVEL AGENT ANTI-THROMBOTIQUE

La thrombose artérielle résulte d'une activation plaquettaire associée à une activation de la cascade de coagulation au niveau de la lésion vasculaire. Il est actuellement montré que la combinaison d'un effet antiagrégant et d'un anticoagulant dans une même molécule a un effet bénéfique contre la thrombose artérielle [178].

1.2.1. PROPRIETES DE EP224283

EP224283 (Fig. 15) est une nouvelle molécule de synthèse combinant une double action anticoagulante et antiagrégante. Elle associe la molécule tirofiban, un antagoniste des récepteurs plaquettaires GP IIb/IIIa, à la molécule idraparinux, un inhibiteur du facteur Xa. Le tirofiban et l'idraparinux sont reliés par une biotine.

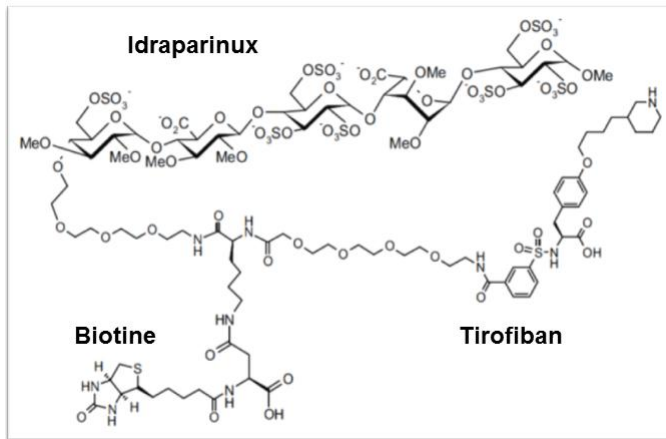


Fig. 15 : Structure chimique de EP224283

Le tirofiban, un dérivé de la tyrosine d'un poids moléculaire de 495 kD, est un inhibiteur très sélectif de la liaison du fibrinogène au récepteur membranaire plaquettaire le plus exprimé, le GP IIb/IIIa. Il est montré que l'étape finale incontournable de l'activation plaquettaire, quelque soit le stimulus initial, est la liaison entre le fibrinogène et la glycoprotéine membranaire de la plaquette activée GP IIb/IIIa. Ainsi, le tirofiban possède un fort potentiel anti-thrombotique [179].

L'idraparinux est un inhibiteur sélectif du facteur Xa ayant une demi-vie longue. Il agit en liant spécifiquement l'antithrombine, entraînant une inhibition 300 fois supérieure du facteur Xa par l'antithrombine [180]. Le facteur Xa est situé à un niveau critique de la cascade de la coagulation, à la convergence des voies extrinsèque et intrinsèque de la coagulation et en amont de la thrombine. Le niveau de la sérine protéase étant amplifié à chaque étape de la cascade de la coagulation, les anticoagulants ayant des cibles situées les plus en amont telles que le facteur Xa sont plus efficaces. L'idraparinux n'est pas métabolisé, il est totalement biodisponible et ne se lie pas aux protéines plasmatiques, en particulier au facteur 4 plaquettaire, évitant ainsi les thrombopénies induites par l'héparine [181].

Une biotine relie l'idraparinux et le tirofiban. Cette biotine se lie fortement et rapidement à l'avidine, une glycoprotéine tétramérique de 66 kD qui contient 4 monomères identiques possédant chacun un site de liaison de très forte affinité à la biotine. Cette liaison forte biotine/avidine est utilisée comme antidote afin de neutraliser de façon sélective, rapide et définitive, une molécule ayant une biotine [182].

EP224283 montre dans une étude préclinique sur différents modèles de thrombose une meilleure efficacité que l'association des 2 molécules mères administrées conjointement [178]. Or, les deux classes thérapeutiques des molécules mères ont montré des effets bénéfiques après implantation d'un stent, en particulier contre la resténose et la thrombose.

1.2.2.EFFET DES MOLECULES ANTI GP IIb/IIIa APRES IMPLANTATION D'UN STENT

Chez l'homme, une méta-analyse de 2008 montre que l'administration d'un anti GP IIb / IIIa lors d'une procédure de revascularisation coronarienne endovasculaire permet une réduction du risque absolu de mortalité à 30 jours de 0,38% ; le bénéfice se maintenant jusqu'à 1 an après la procédure. Les effets bénéfiques se traduisent par une réduction du taux d'infarctus du myocarde ainsi que du taux de revascularisations itératives. L'utilisation d'un anti GP IIb / IIIa est associé à une majoration des saignements mineurs et des thrombopénies, mais pas des saignements majeurs [183].

Parmi les 3 molécules anti GP IIb / IIIa (l'abciximab, le tirofiban et l'eptifibatide), l'abciximab et l'eptifibatide ont en plus de leur affinité pour GP IIb / IIIa, une affinité pour $\alpha_v\beta_3$, qui permet une réduction de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses vasculaires après une effraction endothéliale. Le tirofiban semble avoir une liaison non spécifique avec $\alpha_v\beta_3$ [184]. Des stents imprégnés à l'abciximab ont montré chez le porc puis chez l'homme, une réduction du taux d'hyperplasie néoinimale. Cette hyperplasie, de 28% dans le groupe contrôle, est réduite à 14% dans le groupe stents imprégnés à l'abciximab [148]. Aucune thrombose n'est survenue chez les 49 patients traités avec un stent imprégné d'abciximab et une bithérapie antiagrégante [149].

1.2.3.EFFET DES MOLECULES ANTI FACTEUR XA APRES IMPLANTATION D'UN STENT

Plusieurs études précliniques montrent que les stents imprégnés à l'héparine réduisent leur thrombogénicité, sans toutefois montrer d'effet sur l'hyperplasie néointimale [142, 143]. D'autres études démontrent en plus de la réduction de la thrombogénicité du stent, un effet anti-prolifératif de l'héparine. Ainsi, un stent libérant localement de l'héparine permet à la fois une réduction de la thrombose et de la resténose sur des artères coronaires de porc [144, 145].

Chez l'homme, les stents imprégnés à l'héparine ont un taux très bas de thrombose de stent. Dans certaines études, le taux de thrombose est significativement moindre comparativement aux stents nus (0,29% vs 2,44% respectivement) ; dans d'autres études, la différence est non significative en raison d'un taux de thrombose très faible également avec l'utilisation des stents nus (0,5%) [147]. Au final, une méta-analyse datant de 2005 montre un taux de thrombose de 0,6% avec les stents à l'héparine, et de 0,9% avec les stents nus, la différence étant non significative, probablement en raison d'un manque de puissance de l'étude [185].

Toutefois, l'étude HOPE démontre qu'après implantation du stent imprégné à l'héparine Hepacoat, un traitement par aspirine seule est possible sans risque pour le patient, le taux de thrombose de stent étant équivalent à celui d'un stent nu associé à la double antiagrégation habituelle (1% à 30 jours) [146]. Mais la double antiagrégation prolongée est associée à des effets secondaires hémorragiques chez 10,5% des patients, ayant pour conséquences des hospitalisations prolongées, des évènements cardiaques graves ou mortels et des arrêts de traitement [186]. Un traitement par aspirine seule après implantation d'un stent présente donc un fort intérêt.

1.3.HYPOTHESES DE TRAVAIL

A partir des travaux résumés précédemment, nous avons émis les hypothèses suivantes :

- L'hémine, inducteur et substrat de l'HO-1 qui possède des propriétés anti-inflammatoires, anti-prolifératives sur les cellules musculaires lisses, pro-angiogéniques et anti-apoptotiques sur les cellules endothéliales, pourrait avoir des effets bénéfiques après implantation d'un

Étude *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques

stent, en limitant l'hyperplasie néointimale tout en favorisant la ré-endothélialisation des mailles du stent.

- EP224283, combinant les effets du tirofiban et de l'idraparinux avec une efficacité accrue, pourrait avoir un effet bénéfique après implantation du stent en réduisant la thrombogénicité du stent tout en limitant l'hyperplasie néointimale.

Afin de tester ces deux hypothèses, le but de cette première partie de travail de thèse était d'analyser l'effet *in vivo* d'un traitement par hémine et par EP224283 dans des modèles de resténose intra-stent chez le rat et chez le lapin, d'en explorer les mécanismes d'action, et de vérifier l'effet de ces molécules sur la viabilité et la prolifération cellulaire *in vitro*.

Dès lors, mes objectifs étaient les suivants :

- étudier les effets du traitement par hémine et par EP224283 sur la resténose intra stent et étudier les mécanismes cellulaires impliqués ;
- déterminer la ré-endothélialisation du stent après administration d'hémine ;
- démontrer que le mécanisme d'action de l'hémine est effectivement médié par l'activation de l'HO-1 ; et comparer l'action de EP224283 et EP37122, qui correspond à la même molécule sans le tirofiban, afin d'en déterminer le site actif ;
- distinguer le rôle du CO endogène de celui de la bilirubine via l'étude des effets d'un donneur exclusif de CO (le CORM-3) sur la RIS ;
- déterminer l'effet *in vitro* de l'hémine et de EP224283 sur la viabilité et la prolifération des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales.

Ce premier travail est destiné *in fine* à déterminer l'intérêt ou non de développer et évaluer un stent imprégné à l'hémine ou à EP224283.

2. MATERIELS ET METHODES

Les protocoles d'expérimentations ont été approuvés par le Comité Régional d'Ethique pour l'Expérimentation Animale (CL 2007-015, CL 2008-028, CEEA 212011). Les interventions chirurgicales étaient réalisées par un seul opérateur.

2.1. MODELES ANIMAUX DE RESTENOSE INTRA STENT

2.1.1. LE RAT

Les expériences étaient réalisées sur des rats mâles Wistar (400-450 g, Elevage Charles Rivers, France). Nous avons utilisé le modèle de resténose par implantation d'un stent dans l'aorte abdominale de rat décrit par Lowe [150]. Avant l'implantation, les animaux étaient séparés de façon aléatoire en animaux témoins ou en animaux traités. Sous anesthésie générale (ketamine 130 mg/kg et xylazine 14 mg/kg par voie intrapéritonéale (ip)), par laparotomie, l'aorte sous rénale était exposée et libérée de la veine cave. Après héparinisation systémique (héparine non fractionnée 100 UI/kg IV), l'aorte était clampée en sous rénale et une aortotomie réalisée pour l'introduction du stent juste en amont de la bifurcation aorto-iliaque. Des stents inertes coronariens humains expansibles sur ballon (BX Sonic en acier inoxydable pour les expériences sur l'hémine, et Presillion™ en cobalt chrome pour les expériences sur EP224283, Cordis®, Johnson & Johnson) d'un diamètre de 2,5 mm et d'une longueur de 10 à 24 mm étaient utilisés. La répartition des différentes longueurs de stent était homogène selon les groupes. Les stents étaient déployés à leur pression nominale, soit 8 atmosphères durant 10 secondes, puis après retrait du matériel, l'aortotomie était fermée par des points séparés de Prolène 8/0. Les animaux recevaient en postopératoire un traitement analgésique (buprénorphine 0,20 mg/kg/j durant 72 heures) et un régime normal *ad libitum*. Aucun antiagrégant plaquettaire ne leur était administré.

Les animaux étaient sacrifiés 7 ou 28 jours après l'implantation du stent. A cette date, les animaux étaient anesthésiés comme précédemment, et après héparinisation systémique (héparine non fractionnée 300 UI/kg IV), 10 ml de sang étaient prélevés. Le segment d'aorte abdominale stentée était prélevé avant euthanasie par exsanguination sur animaux anesthésiés. Les plasmas étaient collectés après centrifugation (3000 rpm 10 min à 4°C) puis conservés à -20°C pour analyse biochimique ultérieure. L'aorte stentée était soit congelée pour analyse par western blot, soit fixée par le paraformaldéhyde (PAF) 4% pour inclusion en résine et analyse en microscopie optique ou en microscopie électronique.

2.1.2. LE LAPIN HYPERCHOLESTEROLEMIQUE

Les expérimentations étaient réalisées chez des lapins mâles White New Zealand (3,5-4 kg, INRA, Nouzilly, France). Quatre semaines avant l'implantation du stent, le régime hypercholestérolémique (régime standard + 1% de cholestérol en poudre) était initié puis poursuivi durant toute la durée de l'expérimentation. Un dosage de la cholestérolémie par prélèvement à l'oreille était réalisé la semaine précédant l'implantation du stent, ainsi que lors du sacrifice des animaux. La veille de l'implantation du stent, l'administration via l'eau de boisson d'aspirine (pour une dose de 5 mg/kg/j) était initiée et poursuivie durant toute l'expérimentation.

L'implantation des stents était effectuée sous contrôle radioscopique (Fig. 16), après autorisation de l'Autorité de Sûreté Nucléaire sous le numéro T370416. Après un jeun de 12 heures, les animaux étaient anesthésiés (NALGEN® 0,45 ml/kg IM et RAMPUN® 0,35 ml/kg IM), puis intubés par voie oro-trachéale et ventilés. Après cervicotomie médiane, l'artère carotide primitive droite était disséquée et un désilet 5F était mis en place, permettant une injection intra-artérielle de 100 UI/kg d'héparine non fractionnée, de 0,3 ml de RISORDAN® et de 5 mg/kg d'aspirine. Sous contrôle fluoroscopique, un guide hydrophile de 0,035' (Terumo®) était descendu jusqu'au niveau de l'aorte abdominale. Une acquisition graphique de la bifurcation aorto-iliaque était réalisée par injection de 5 ml de produit de contraste iodé, puis les artères iliaques étaient successivement cathétérisées à l'aide d'un guide 0,014' (Terumo®). Un stent coronarien surdimensionné en diamètre de 30% était implanté dans chacune des artères iliaques (BX Sonic, Cordis®, Johnson & Johnson, diamètre 3mm et longueur 10 à 24 mm répartie de façon homogène entre les groupes). Après vérification de la bonne perméabilité des axes artériels, le matériel était retiré et la carotide primitive droite ligaturée. En fin d'intervention, une antibioprofylaxie par BORGAL 7,5% (0,2ml par voie intramusculaire) était administrée, ainsi qu'un traitement antalgique par Buprénorphine 0,05mg/kg par voie sous cutanée durant 3 jours.

A 28 jours de l'implantation des stents, les lapins étaient anesthésiés et l'artère carotide primitive gauche ré-abordée comme décrit précédemment. Une acquisition graphique aorto-iliaque était réalisée afin d'évaluer la perméabilité des vaisseaux, puis les animaux étaient euthanasiés par injection d'une forte dose de barbituriques. Les deux artères iliaques stentées étaient prélevées et

fixées par du PAF 4% pour inclusion en résine et analyse en microscopie optique ou en microscopie électronique.

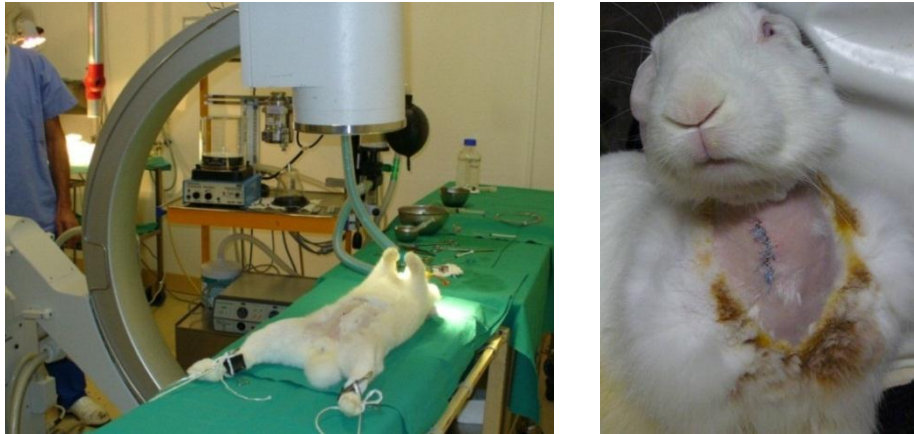


Fig. 16 :
Implantation des
stents chez le lapin
sous contrôle
radioscopique par
voie carotidienne.

2.2.METHODES D'ANALYSE DES ARTERES STENTEEES

2.2.1.ETUDE HISTOMORPHOMETRIQUE PAR MICROSCOPIE OPTIQUE

L'analyse histomorphométrique permet la quantification de l'hyperplasie néoinimale. Celle-ci est décrite comme étant maximale 28 jours (J28) après implantation du stent dans les modèles animaux [153]. Nous avons donc choisi ce délai pour effectuer nos analyses.

Selon la technique décrite [187], les aortes ou artères iliaques stentées étaient rincées au sérum physiologique puis fixées dans du PAF 4% durant 12 heures. Elles étaient ensuite déshydratées par bains d'alcool de concentration croissante (70%, 80%, 96%, 100%, 100%, 30 min/bain) puis par un bain de xylène (30 min), et incluses en résine méthylméthacrylate (Technovit®9100, Heraeus Kulzer, Allemagne). Brièvement, les aortes étaient placées dans une solution de pré-infiltration (1 heure à température ambiante), puis dans une solution d'infiltration (12 heures à 4°C) et finalement dans des capsules de gélatine remplies de résine. La polymérisation s'effectuait à -20°C durant 5 jours, puis à 4°C durant 8 jours. Les échantillons étaient ensuite coupés en sections transversales de 60µm (microtome Leica équipé d'une lame en tungstène) et colorés par hématoxyline-éosine. Les coupes étaient examinées en microscopie optique (grossissement x5), puis enregistrées sous format numérique (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss

Microscopy, Germany). Après numérisation, 15 coupes par rats, réparties tout au long du stent de façon aléatoire, étaient analysées en aveugle avec le logiciel d'analyse d'image ImageJ (Image J 1.45 pour Windows).

L'aire de la néointima (n) était déterminée par la différence entre la surface délimitée par la limitante élastique interne, et la surface de la lumière artérielle et des mailles du stent. L'aire de la média (m) était déterminée par la différence entre la surface délimitée par le périmètre interne de l'adventice et la surface présente sous la limitante élastique interne. La proportion de remodelage était quantifiée par la mesure du ratio n/m correspondant à l'aire de la néointima divisée par l'aire de la média (Fig. 17).

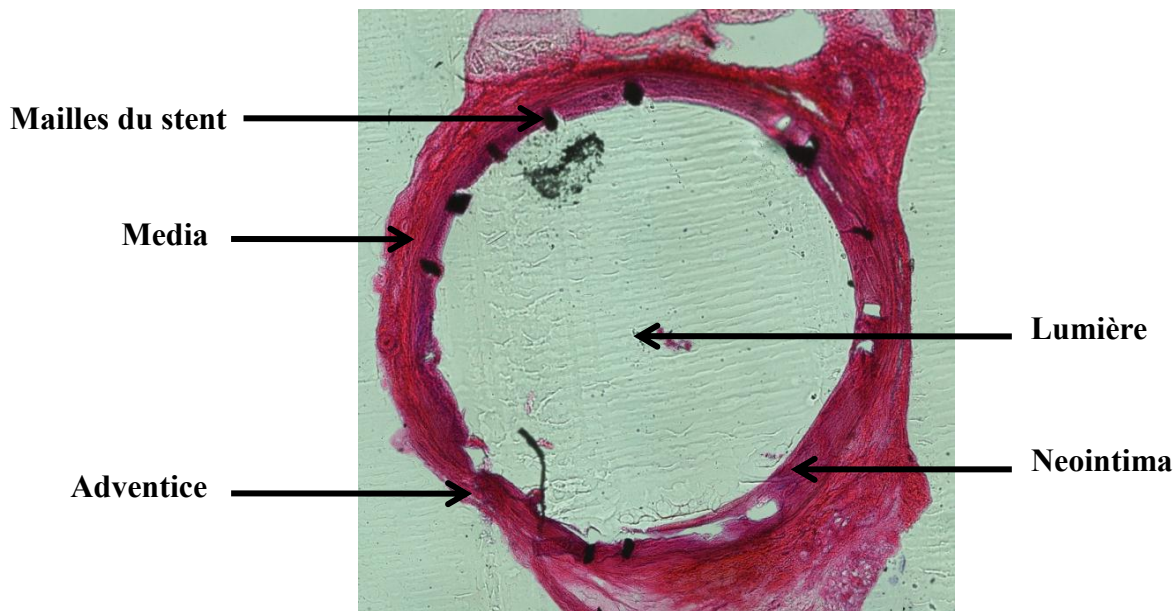


Fig. 17 : Coupe transversale caractéristique d'aorte de rat stentée, analysée en microscopie optique (x5) puis numérisée.

2.2.2.ÉTUDE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

L'étude en microscopie électronique (ME) était réalisée afin d'étudier la morphologie des cellules recouvrant les mailles des stents et d'évaluer la surface de recouvrement des mailles, ainsi que la proportion de ré-endothélialisation du stent 28 jours après son implantation. Les artères stentées étaient prélevées puis fixées dans une solution tampon de 4% de PAF et 1% de

glutaraldéhyde (pH = 7,2). Chaque artère était ensuite coupée longitudinalement, une moitié étant utilisée pour l'analyse en ME à transmission (MET) et l'autre en ME à balayage (MEB).

MET. Après déshydratation dans des bains d'éthanol de titres croissants et 2 lavages à l'oxyde de propylène les prélèvements étaient inclus dans une résine Epon pure et incubés 48 heures à 60°C pour permettre la polymérisation. Des coupes ultra-fines étaient réalisées à l'aide d'un ultramicrotome (Reichert Scientific Instruments) et contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, avant d'être observées en MET (Jeol 1011, Jeol).

MEB. Après une post-fixation en solution de tétraoxyde d'osmium (OsO₄) à 2%, les échantillons étaient déshydratés en bains d'acétone croissants (50°, 70°, 90°, absolu), traités par la méthode du point critique utilisant le CO₂ pour dessiccation, et rendus conducteurs par métallisation avec du platine par pulvérisation cathodique (couche d'environ 5 nm). Ainsi métallisés, ils étaient ensuite observés au MEB doté d'un canon à émission de champ (Zeiss Gemini 982) et numérisés.

Marquage immunochimique. Des sections ultrafines étaient incubées avec un anticorps polyclonal de chèvre dirigé contre la molécule d'adhésion endothéliale CD31 (SantaCruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, Californie), puis avec un anticorps secondaire marqué à l'or colloïdal (particules d'or de 15 nm) (Sciences Electron Microscopy, Euromedex, France). A chaque segment de stent, 3 mailles entourées de néointima étaient choisies au hasard pour le marquage.

2.2.3. WESTERN BLOT ET ANTIBODY ARRAY

Nous avons analysé l'expression et l'activation des protéines de différentes voies de signalisation et des cytokines à 7 jours de l'implantation du stent, délais correspondant au pic d'induction des mécanismes cellulaires et de réponse inflammatoire [188], ainsi qu'à 28 jours de l'implantation, délai correspondant au maximum d'hyperplasie néointimale dans ces modèles animaux [153].

Les artères stentées et congelées étaient ouvertes longitudinalement et le stent délicatement retiré du tissu. Le tissu artériel était ensuite homogénéisé à froid dans du tampon de lyse (CellLytic™, Sigma-Aldrich, France) par le broyeur de tissu MACSTM (Miltenyi Biotec, France), puis

centrifugé (10 000 g, 20 min à 4°C) et le surnageant collecté. La concentration protéique de chaque échantillon était déterminée par la méthode BCA (dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique). Sur un même gel de polyacrylamide à 10 ou 15%, chaque échantillon était déposé à une même quantité de protéines totales allant de 10 à 100 µg, dénaturée par ajout d'un volume semblable de tampon de dénaturation (tampon Laemmli). La quantité de protéine déposée et le type de gel utilisé dépendait de la nature et de l'expression de la protéine recherchée. Le gel était ensuite transféré sur membrane de nitrocellulose par Western Blot et incubé avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt (dilué dans du TBS Tween 1% et BSA 4%), puis avec l'anticorps secondaire (dilution 1/5000 dans du TBS Tween 1% et lait écrémé en poudre à 5%). Finalement, les membranes étaient révélées par chimioluminescence (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, France), et quantifiées par analyse densitométrique (MultiGauge V3.0, FUJIFILM Graphic Systems, France S.A.S.).

La détection des protéines de différentes voies de signalisation était réalisée en utilisant les anticorps primaires spécifiques dirigés contre les protéines suivantes : caspase 3 et caspase 3 clivée, HO-1, p38 MAPK et phospho p38 MAPK, ERK 1/2 et phospho ERK 1/2, Akt totale et phospho Akt^{Thr_308} (Cell Signaling, France) ; actine et HO-1 (Sigma-Aldrich, France) ; p21, p27^{kip1} et Ki67 (Santa Cruz Biotechnology, Tébu-bio, France) ; Rho-A totale et Rho-A activée (RhoA Activation Kit, Upstate, Millipore, France). Pour la détection de la protéine RhoA activée, un traitement préalable selon les consignes du kit était réalisé. Le niveau d'expression des cytokines et chemokines pro-inflammatoires produites à J7 était quantifié grâce à l'utilisation d'une puce à anticorps (Rat Cytokine Array Panel A, Proteome Profiler™, R&D Systems, France).

2.3. ADMINISTRATION *IN VIVO* DES MOLECULES ETUDIEES

2.3.1. BIODISPONIBILITE ET BIOACTIVITE

Des travaux préliminaires à ce travail de thèse, brièvement résumés ci-après, nous ont permis de déterminer la biodisponibilité des produits testés ainsi que leur activité, afin de déterminer la dose à administrer ainsi que la voie d'administration.

Hémine. En accord avec la littérature [172, 189], nous avons testé l'administration d'hémine (Fluka, Sigma-Aldrich) à des doses de 6 mg/kg/48h, 50 mg/kg/48h et 100 mg/kg/48h par voie intrapéritonéale. La solution d'hémine, préparée extemporanément avant chaque injection, était dissoute dans un tampon phosphate (PBS) alcalinisée (pH = 12) afin de permettre une meilleure dilution de l'hémine puis neutralisée (pH = 7,4) avant l'injection. Le dosage de l'hémine plasmatique, la cinétique d'expression de l'HO-1 quantifiée par western blot sur du tissu aortique, et l'évaluation de l'activité de l'HO-1 par quantification de la bilirubine plasmatique étaient réalisés. Les résultats montraient un taux croissant d'activité selon le temps et la dose administrée. L'induction et l'efficacité de l'HO-1 était significative à 50 mg/kg/48h. Nous avons donc décidé d'administrer l'hémine à une dose de 50 mg/kg/48h par voie intrapéritonéale (ip), les fortes doses pouvant être hépatotoxiques. La première injection était effectuée 48 heures avant l'implantation du stent, afin de permettre l'induction de l'HO-1 avant implantation.

EP224283 était gracieusement fourni par Endotis Pharma (Romainville, France). Dès sa réception sous forme de poudre, EP224283 était solubilisé dans du sérum physiologique puis alicoté et congelé à -20°C. EP224283 est déjà évalué dans plusieurs modèles de thrombose chez la souris [13]. Chez le rat, les tests de thrombose et les dosages d'activité anti Xa montraient que EP224283 a une biodisponibilité de 100% après administration sous cutanée (sc) et une demi-vie de 10 à 12 heures. Une protection optimale contre la thrombose était obtenue par une injection de 0,1 µmol/kg. Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'administrer EP224283 à une dose de 0,4 µmol/kg/48h (soit 1,25 mg/kg/48h) par voie sous cutanée, la première injection étant réalisée le matin de l'implantation. Des tests identiques réalisés chez le rat avec EP37122 ont montré une biodisponibilité de 100% après administration sous cutanée et une demi-vie de 2,2 heures. La protection optimale contre la thrombose était obtenue pour une dose de 0,6 µmol/kg. Nous avons donc décidé d'administrer EP37122 à la dose de 6 µmol/kg/24h (soit 10,2 mg/kg/24h) par voie sous cutanée.

Les animaux témoins implantés avec un stent nu ou un stent actif au sirolimus étaient traités à la même fréquence, au même volume et selon le même mode d'administration avec du sérum physiologique.

Un suivi hebdomadaire du statut pondéral des animaux était effectué.

2.3.2.REPARTITION DES LOTS EXPERIMENTAUX D'ANIMAUX ET DES TRAITEMENTS ADMINISTRES

2.3.2.1.EXPERIMENTATION AVEC L'HEMINE

L'étude des effets de l'hémine était conduite sur plusieurs lots de rats et un lot de lapins répartis comme représenté sur le diagramme 1.

Pour chaque rat, un stent nu (BX Sonic, Cordis®, Johnson & Johnson) ou un stent actif (Cypher, Cordis®, Johnson & Johnson) était implanté. Chaque rat recevait un traitement d'un volume de 0,5 ml de sérum physiologique ou d'hémine administré en ip 48 heures avant la pose du stent puis toutes les 48 heures durant l'expérimentation (J7 ou J28). Ils étaient répartis comme suit :

- Rats témoins avec stents nus (n=36) ou actifs (n=3) : sérum physiologique ip ;
- Rats hémine (n=30) : 50 mg/kg/48h d'hémine ip;
- Rats traités par un inhibiteur de l'HO-1 (n=4) : injections d'étain protoporphyrine IX (SnPP) (Frontier Scientific Europe Ltd), 15mg/kg/48h ip solubilisé dans du PBS ;
- Rats hémine + inhibiteur de l'HO-1 (n=4) : injections d'hémine 25 mg/kg/48h et d'étain protoporphyrine IX (SnPP) 25 mg/kg/48h ip ;
- Rats traités par donneur exclusif de monoxyde de carbone (n=5) : injections de CORM-3 (tricarbonylchloroglycinate de ruthénium, don du Pr. Roberto Motterlini, University College London, UK), 30 mg/kg/48h ip solubilisé dans du PBS.

Pour chaque lapin 2 stents nus (BX Sonic) ou actifs (Cypher) étaient implantés, associés à un traitement d'un volume de 5 ml de sérum physiologique ou d'hémine administré en ip 48 heures avant la pose du stent puis toutes les 48 heures durant l'expérimentation (J28) réparti comme suit :

- Lapins témoins (n=7) : 2 stents nus (n=4) ou 1 nu + 1 actif (n=3) : sérum physiologique ip
- Lapins hémine (n=8) : 2 stents nus : hémine 50 mg/kg/48h ip

Étude *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques

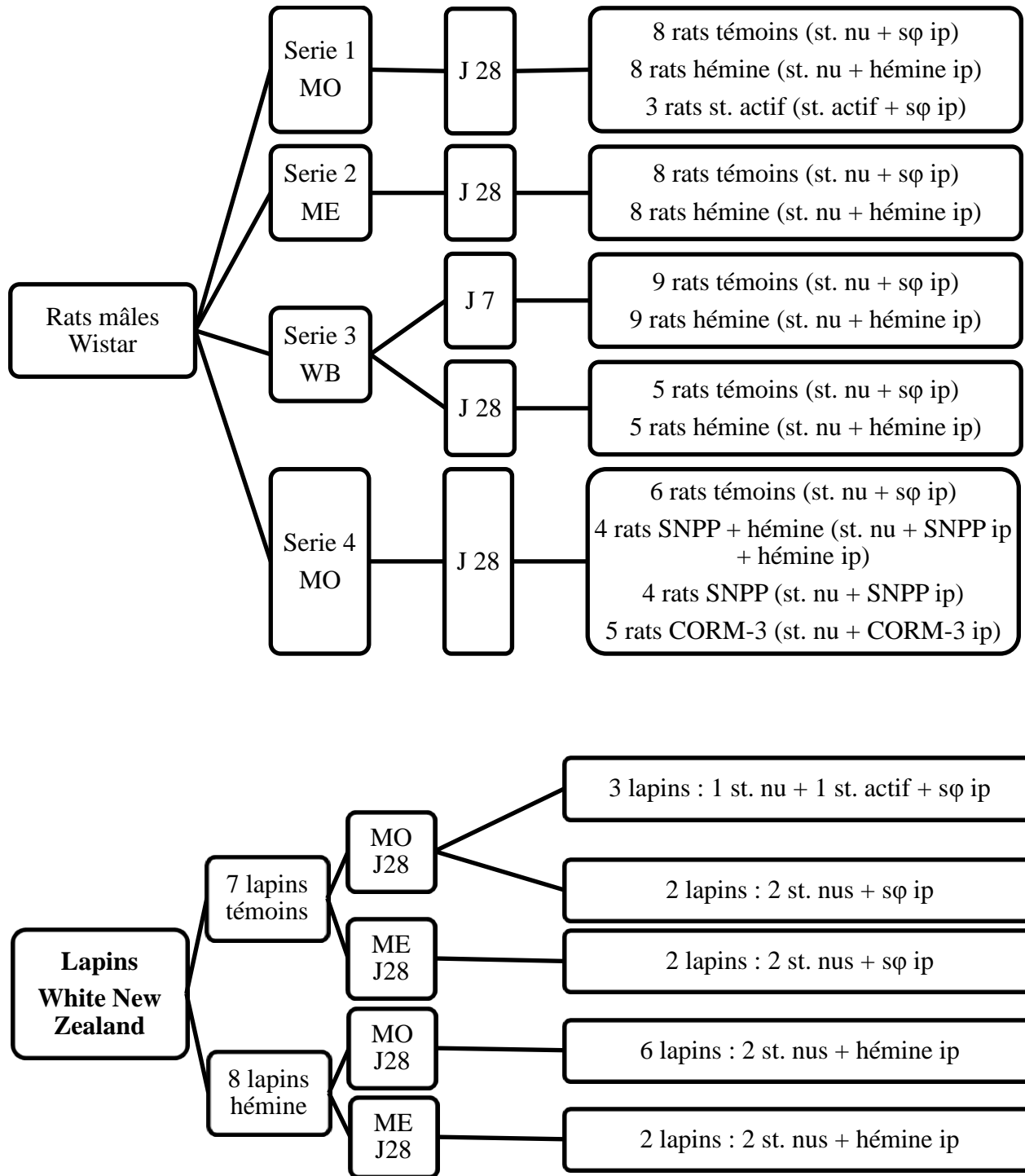


Diagramme 1 : Répartition des animaux tests pour l'hémine. MO : microscopie optique ; ME : microscopie électronique ; WB : western blot ; J : nombre de jours après implantation ; st. : stent ; sφ : sérum physiologique ; ip : injection par voie intrapéritonéale.

2.3.2.2. EXPERIMENTATION AVEC EP224283

L'étude des effets de EP224283 était réalisée à partir de différents lots de rats répartis comme représenté sur le diagramme 2.

Pour chaque rat, un stent nu (Presillion™) ou un stent actif (Cypher™) était implanté et un traitement d'un volume de 0,3 ml de sérum physiologique ou d'EP224283 administré en sous cutané le matin de l'implantation du stent puis durant toute l'expérimentation (J7 ou J28) et réparti comme suit :

- Rats témoins avec stents nus (n=20) ou actifs (n=3) : sérum physiologique/48h sc ;
- Rats EP224283 (n=17) : 1,25 mg/kg/48h d'EP224283 sc ;
- Rats EP37122 (n=9) : 10,2 mg/kg/24h d'EP37122 sc.

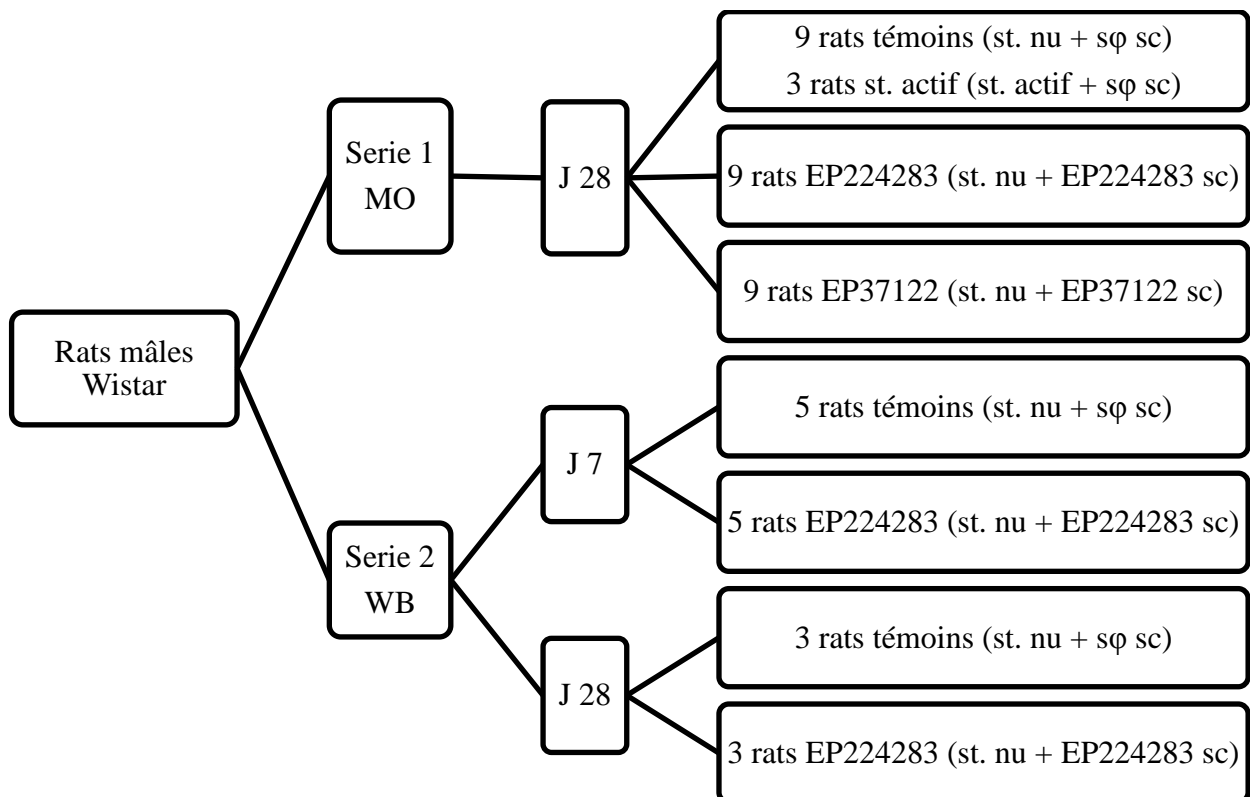


Diagramme 2 : Répartition des animaux tests pour EP224283. MO : microscopie optique ; WB : western blot ; J : nombre de jours après implantation ; st. : stent ; sφ : sérum physiologique ; sc : injection par voie sous cutanée.

2.4. ANALYSE IN VITRO DE LA CYTOTOXICITE DES MOLECULES ETUDIEES

Culture cellulaire. Des cellules musculaires lisses de coronaires humaines (HCASMCs) et des cellules endothéliales (HCAECs) (PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) étaient mises en culture dans un milieu spécifique (C22062 or C22022, PromoCell), supplémenté avec de la pénicilline et de la streptomycine (50 UI/ml, PromoCell), dans une atmosphère à 37°C saturée à 5% de CO₂. Le milieu de culture était remplacé tous les 3 jours. A 70–80% de confluence, les cellules étaient trypsinisées etensemencées dans une plaque 96 puits. Les cellules en passage 2 à 4 étaient utilisées

Evaluation de la viabilité cellulaire après exposition aux molécules d'intérêt. HCASMCs et HCAECs étaientensemencées dans une plaque 96 puits à la concentration de 15 000 cellules/cm². Après 24 heures d'incubation dans du milieu de culture, la monocouche de cellules subconfluentes était exposée à différentes concentrations d'hémine (0, 5, 10, 20, 50 et 100 µM) et de EP224283 (0, 5, 10, 13, 15 mg/ml) durant 48 heures selon le protocole décrit par Wessely [190]. L'évaluation de la viabilité cellulaire s'effectuait par analyse de l'activité enzymatique mitochondriale *via* la coloration AlamarBlue[®] (Interchim Montluçon, France). Brièvement, le milieu de culture de chaque puits était retiré et remplacé par 200µL de milieu supplémenté par 10% de colorant AlamarBlue[®]. Après 3 heures d'incubation, 150 µL du réactif de chaque puits était transféré dans une plaque 96 puits Fluoro-/luminunc (Polylabo, Strasbourg, France) et l'intensité fluorescente était mesurée par le fluoromètre Twinkle LB970 (Berthold Technology, GmbH & Co. KG, Germany) pour une excitation à 560 nm et une émission à 590 nm [191]. Pour chaque concentration et chaque type cellulaire, 2 répliques étaient effectuées et l'expérimentation renouvelée 3 fois.

2.5. ANALYSE STATISTIQUE

Tous les paramètres mesurés étaient exprimés en moyenne assortie de leur erreur standard (moyenne ± ESM). Pour l'analyse histomorphométrique, la valeur du ratio n/m de chaque rat était obtenue à partir de la moyenne de 15 coupes sélectionnées de façon aléatoire pour chaque rat, puis le ratio moyen était calculé pour chaque groupe. Les résultats étaient exprimés en pourcentage de variation par rapport au groupe témoin propre à chaque groupe traité. La

comparaison entre les groupes était réalisée avec le test non paramétrique de Mann Whitney ou le test T. Le seuil de significativité dans la comparaison des groupes était fixé à $p < 0,05$. Les analyses statistiques étaient effectuées avec les logiciels EPI INFO 3.5.3 et GraphPad Prism 4.

3.RESULTATS

3.1.ANALYSE HISTOMORPHOMETRIQUE A J28

3.1.1.TRAITEMENT PAR L'HEMINE

Nous avons vérifié que les modèles utilisés permettaient de quantifier une variation de formation de néointima et donc d'analyser les effets des molécules étudiées sur celle-ci. Pour cela, nous avons implanté des stents actifs au sirolimus - dont l'efficacité sur la réduction de la resténose intra stent est admise - dans chacun des modèles.

Chez le rat (Fig. 18). L'analyse des stents nus du groupe témoin (n=8) 28 jours après l'implantation montrait un anneau concentrique de néointima tout au long du vaisseau stenté, recouvrant largement les mailles, avec un ratio n/m égal à $0,83 \pm 0,06$. Chez les rats implantés avec un stent libérant du sirolimus (n=3), très peu de néointima était observée. Les mailles restaient en partie non recouvertes, avec un ratio n/m égal à $0,45 \pm 0,03$ donc significativement réduit de 46% ($p < 0,01$) permettant la validation du modèle. Chez les rats traités avec de l'hémine (n=8), une fine couche de néointima était observée sur toute la longueur du stent, qui, contrairement aux stents actifs, permettait un recouvrement des mailles. Le ratio n/m dans le groupe hémine était de $0,57 \pm 0,03$, soit significativement réduit de 30% comparativement aux rats témoins ($p < 0,01$).

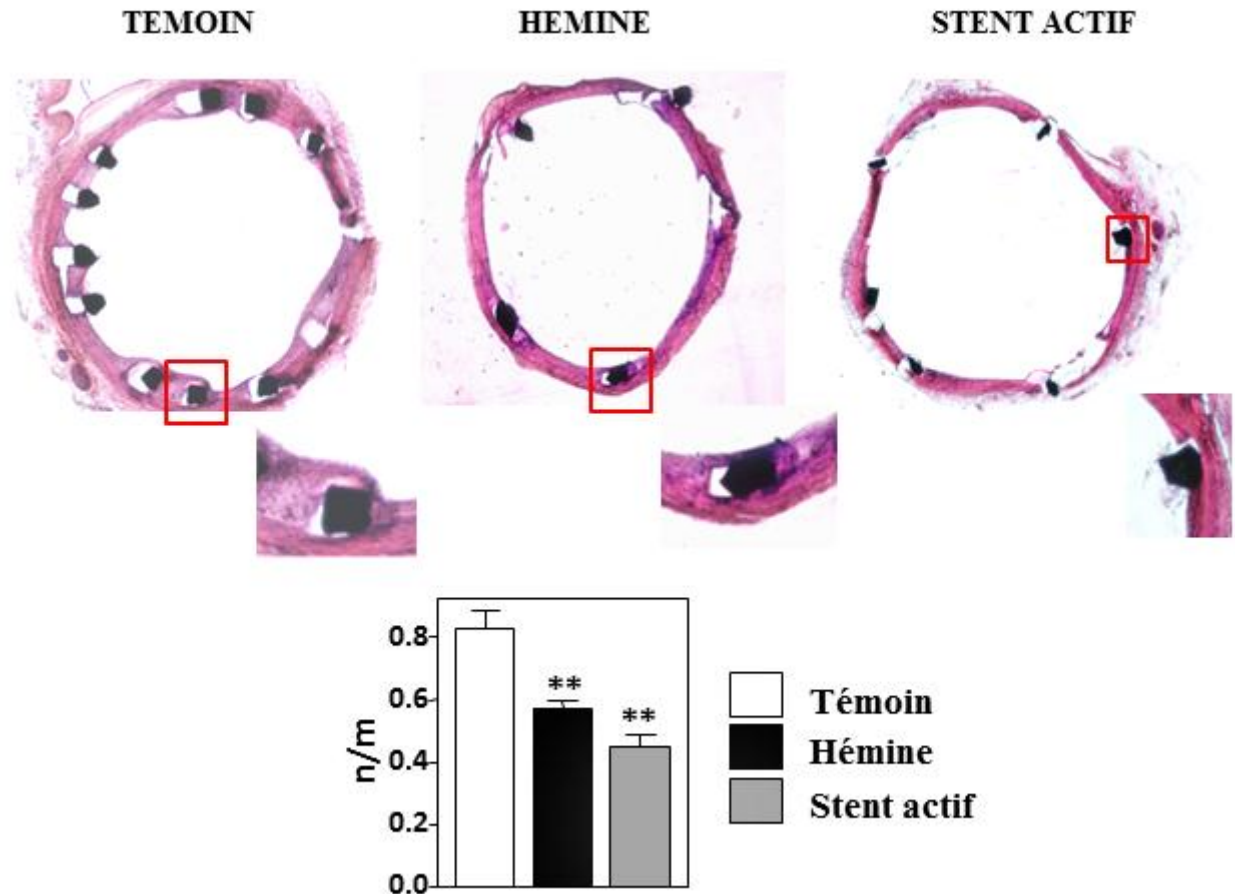


Fig. 18: Coupes transversales caractéristiques d'aortes de rats stentées chez les rats témoins, traités à l'hémine, et implantés avec un stent actif au sirolimus. La quantification de l'hyperplasie néointimale par la mesure du ratio néointima/média (n/m) dans les différents groupes montrait une réduction significative de 30% d'hyperplasie néointimale chez les rats traités à l'hémine comparativement aux témoins. La réduction de 46% de formation de néointima lors de l'implantation d'un stent actif permettait la validation du modèle.

Chez le lapin hypercholestérolémique. Les artériographies peropératoires réalisées à J28 montraient une resténose chez 4 stents nus de lapins témoins, non retrouvée chez les lapins hémine (Fig. 19A). L'analyse histomorphométrique confirmait les résultats chez le rat, avec une quantification du ratio n/m de $1,72 \pm 0,10$ chez les lapins témoins et de $0,90 \pm 0,05$ chez les lapins hémine, soit une réduction significative de 48% de l'hyperplasie néointimale ($p < 0,001$) (Fig. 19B).

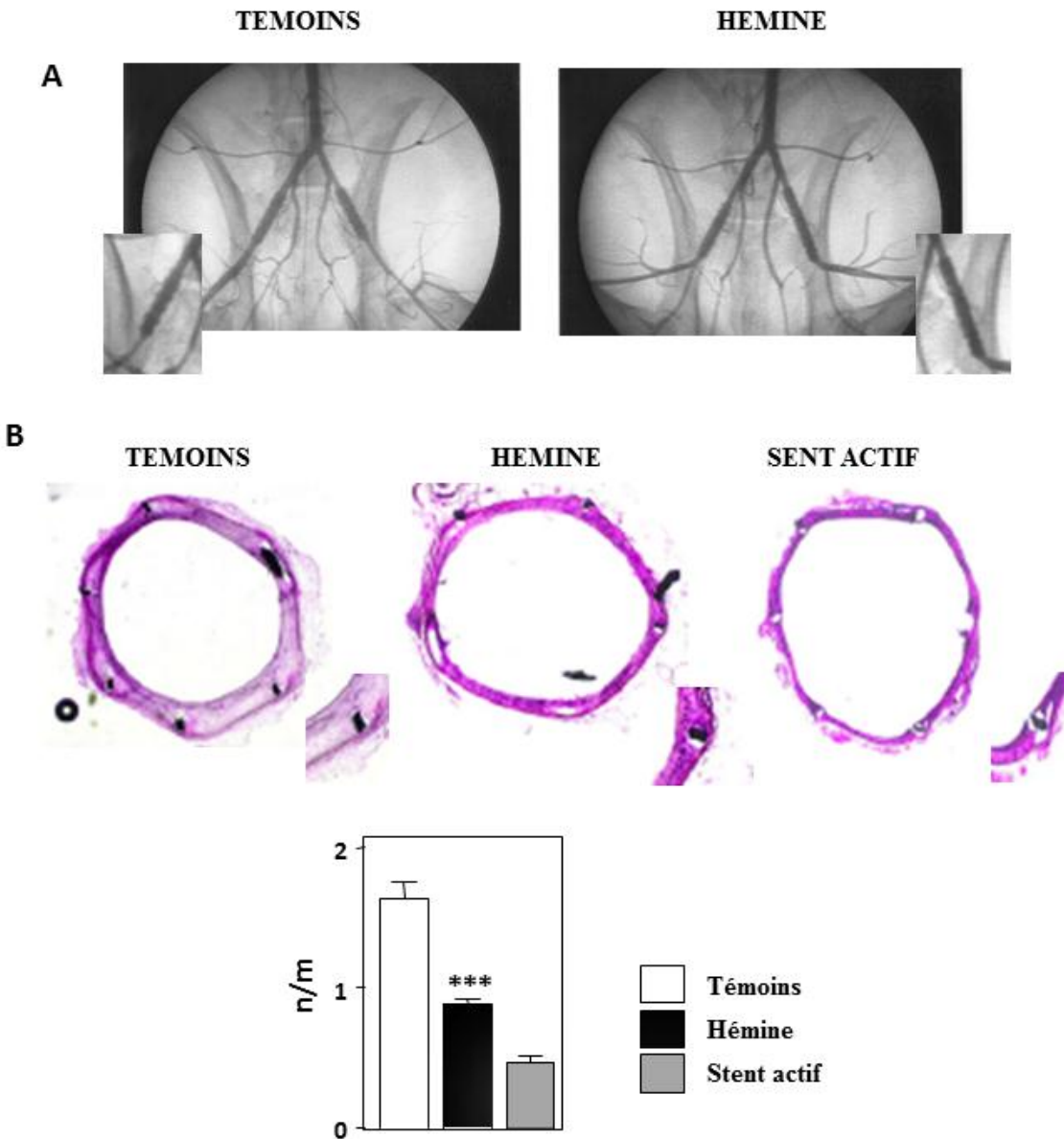


Fig. 19 : **A** : Artériographies caractéristiques à J28 de la bifurcation aorto-iliaque chez un lapin témoin et chez un lapin hémine. **B** : Coupes transversales caractéristiques iliaques de lapins témoin, hémine, stent actif, et quantification du ratio néointima/média (n/m) montrant une réduction significative de néointima (48%) chez les lapins hémine comparativement aux témoins.

3.1.2.EP224283

Chez le rat. L'analyse en microscopie optique des stents nus du groupe témoin révélait un anneau concentrique de néointima, avec une sténose focale intra stent chez 2 rats témoins (sur 9), non retrouvée chez les rats traités (Fig. 20).

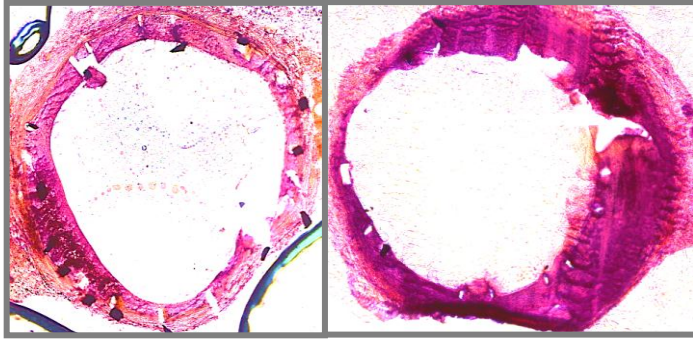


Fig. 20 : Coupes transversales caractéristiques de 2 rats témoins montrant une sténose intra stent focale.

La quantification de la néointima par le ratio n/m était égale à $1,04 \pm 0,14$ (n=9) chez les rats témoins. Chez les rats traités par EP224283, la formation de néointima était plus fine, aucune sténose n'était visualisée, et le ratio n/m était de $0,83 \pm 0,06$ (n=9), soit une réduction significative de 20% comparativement au groupe témoin ($p < 0,001$) (Fig. 21).

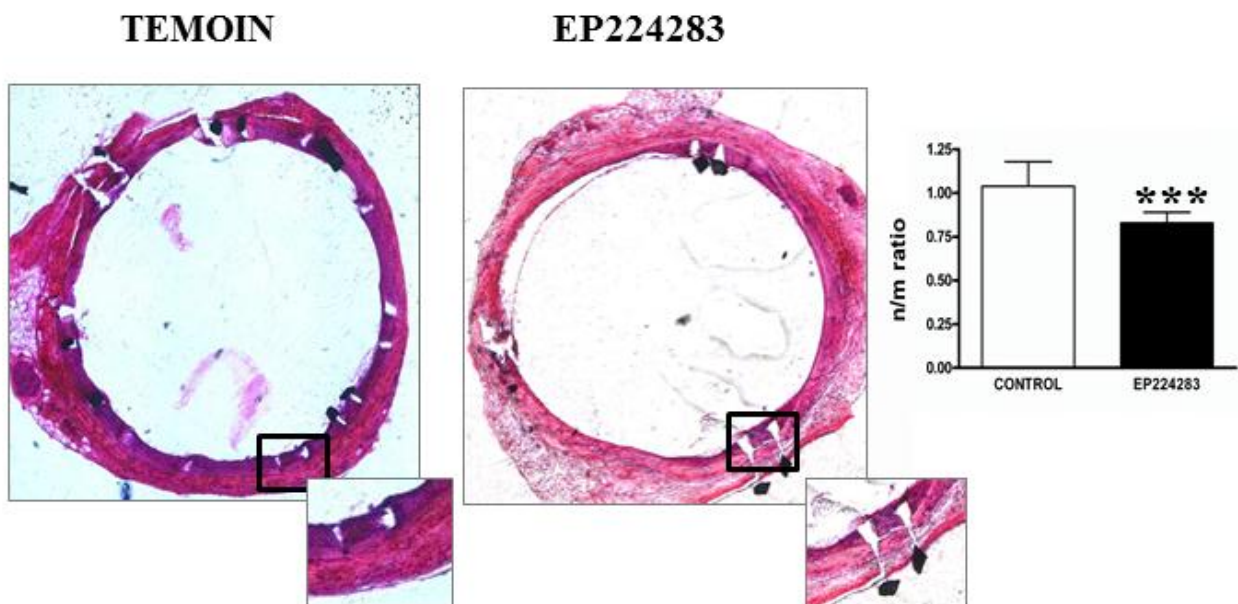


Fig. 21 : Sections transversales caractéristiques d'aorte de rat témoin et traité à EP224283 à J28 de l'implantation du stent, ainsi que la quantification du ratio néointima/média (n/m) montrant une réduction significative de 20% de l'hyperplasie néointimale après traitement par EP224283. *** $p < 0,001$.

3.2. ANALYSE EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DE LA RE-ENDOTHELIALISATION DU STENT APRES TRAITEMENT PAR HEMINE CHEZ LE RAT ET LE LAPIN

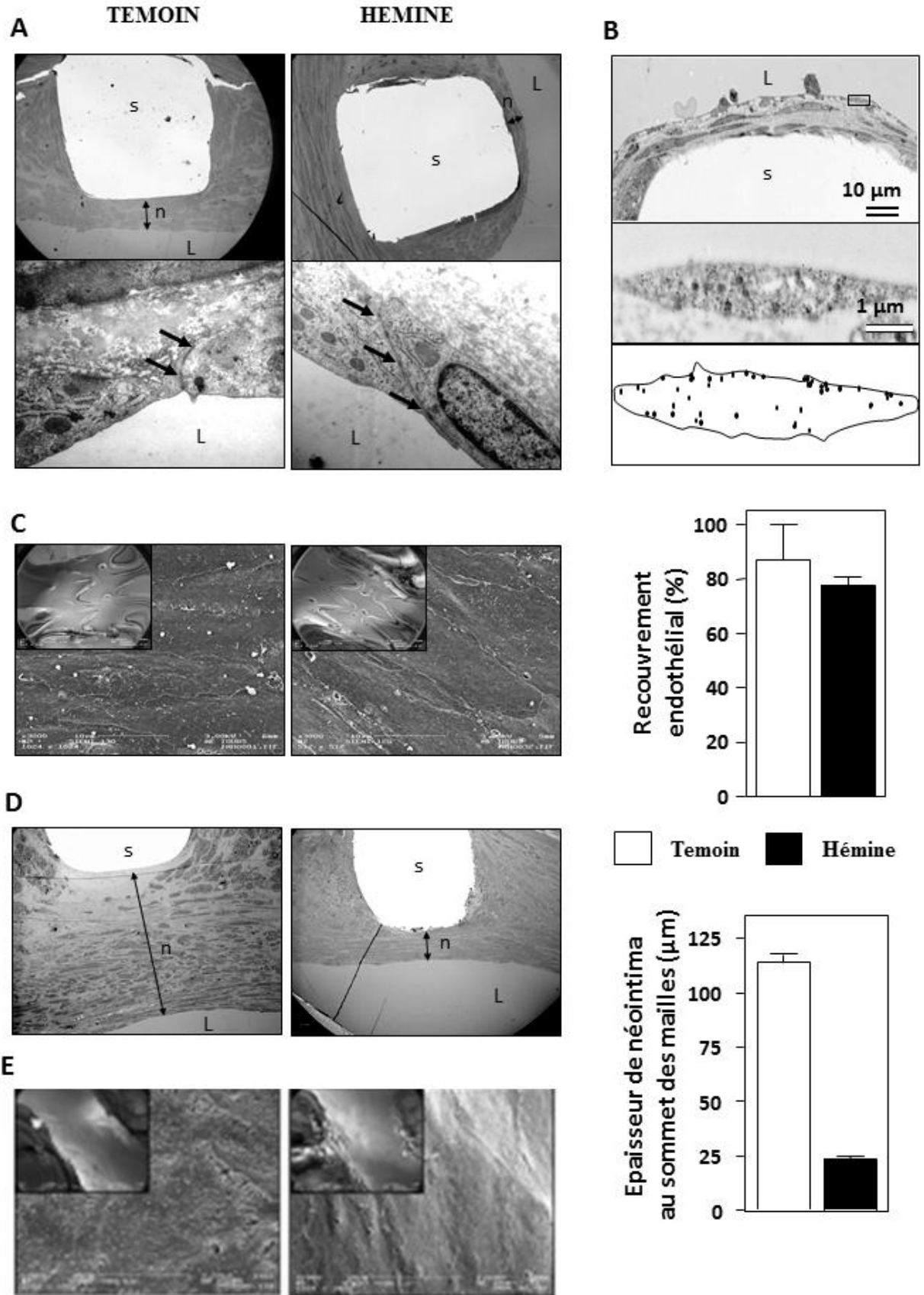
Chez le rat. Nous avons effectué dans un premier temps l'analyse morphologique de la couche cellulaire faisant l'interface entre le métal et le flux sanguin par MET. L'analyse révélait une multicouche de cellules fusiformes au contact du métal du stent, ressemblant à des cellules musculaires lisses vasculaires et à des cellules de type fibroblastique, associées à une matrice extracellulaire. Cette multicouche était deux fois plus importante chez les rats témoins (n=8) comparativement aux rats hémine (n=8) (Fig. 22A). Ce résultat est en accord avec les résultats histomorphométriques précédemment décrits. En avant de cette multicouche était observée une monocouche de cellules ayant une ultra structure comparable à celle des cellules endothéliales en raison de la présence de gap-jonctions, d'endosomes et de réticulum (Fig. 22A). Le marquage positif à l'immunogold CD31, spécifique des cellules endothéliales, confirmait la nature endothéliale de cette monocouche cellulaire faisant l'interface avec le flux sanguin (Fig. 22B). L'analyse en MEB montrait que la proportion de recouvrement global des mailles du stent était comparable entre les rats témoins et les rats hémine (Fig. 22C).

Chez le lapin hypercholestérolémique. Les résultats observés chez le rat étaient confirmés. La quantité de cellules faisant l'interface entre les mailles et le flux sanguin était largement réduite chez les lapins hémine (Fig. 22D). La proportion de recouvrement endothéliale, en dépit du fait que le lapin soit un modèle sujet au retard de ré-endothélialisation, était semblable entre les lapins témoins et les lapins hémine, suggérant l'absence de retard de cicatrisation avec ce traitement (Fig. 22E).

Fig. 22 (page suivante) : **A** : Analyse de la couche cellulaire à l'interface entre la maille et le sang chez le rat avec analyse de l'ultrastructure cellulaire en MET montrant des gap-jonctions. **B** : Marquage immunogold de CD31 caractéristique des cellules endothéliales chez le rat. Grossissement successif et analyse du marquage sur la cellule. **C** : Analyse de la proportion de recouvrement des mailles du stent en MEB chez le rat. **D** : Quantification de l'épaisseur de néointima au sommet des mailles chez le lapin en MET. **E** : Évaluation du recouvrement des mailles chez le lapin.

N : néointima ; L : lumière artérielle ; S : maille de stent

Étude *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques



3.3. ANALYSE DES MECANISMES PROTEIQUES REGULATEURS DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE CHEZ LE RAT

Nous avons tout d'abord réalisé l'étude des mécanismes cellulaires impliqués dans la limitation de la resténose intra stent au 7^{ème} jour post opératoire, date qui correspond au pic de la réaction inflammatoire et de la prolifération cellulaire dans ce modèle [188], puis au 28^{ème} jour, date qui correspond au maximum de formation de néointima [150].

3.3.1. EFFET DE L'HEMINE SUR L'EXPRESSION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA RESTENOSE

Analyse des cytokines et chemokines impliquées dans la réponse inflammatoire à J7 (Fig.23A). L'analyse de l'expression des protéines inflammatoires, à partir des broyats d'aortes stentées, révélait une diminution significative de la réponse inflammatoire chez les rats hémine. Ainsi, les chemokines telles que le facteur RANTES, ICAM-1, les L-selectines et CX3CL1, impliquées dans la mobilisation des cellules inflammatoires (leucocytes, lymphocytes), étaient significativement diminuées de 30 à 50% chez les rats hémine (n=9) comparativement aux rats témoins (n=9) ($p < 0,05$). Les cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire et l'apoptose cellulaire étaient également significativement diminuées chez les rats hémine. En particulier, l'expression de l'interféron α était diminuée par 3 ($p < 0,05$), et le TNF α ainsi que l'interleukine 6 n'étaient pas exprimés dans le groupe hémine alors qu'ils l'étaient dans le groupe témoin.

Expression de l'HO-1 et des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire à J7 (Fig. 23B). L'expression tissulaire de l'HO-1, reflet indirect de l'efficacité du traitement chronique en ip par hémine au niveau du segment aortique stenté, était significativement ($p < 0,01$) augmentée par 2 chez les rats traités hémine (n=9) par rapport aux rats témoins (n=9). Nous avons alors étudié l'effet de l'hémine sur l'activation des protéines intracellulaires impliquées dans la migration (RhoA) et la prolifération (ERK1/2) des cellules musculaires lisses et leurs régulateurs (p21 et p27). L'activation de la protéine ERK1/2 (p-ERK1/2), mesurée par le ratio entre la forme phosphorylée (active) et la forme non phosphorylée (inactive) était significativement réduite par 3 ($p < 0,01$) chez les rats hémine comparativement aux rats témoins. L'activation de la protéine RhoA (GTP-RhoA) était significativement diminuée par 6 ($p < 0,01$) chez les rats hémine.

Étude *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques

L'expression des facteurs de régulation de la prolifération p27^{kip1} et p21 était significativement ($p < 0,05$) plus élevée chez les rats hémine. Le niveau d'activité de la caspase 3, effecteur ultime de l'apoptose cellulaire, était significativement réduit par 7 ($p < 0,05$) chez les rats hémine. Enfin, l'expression de la protéine Ki-67, marqueur de la prolifération cellulaire, était significativement réduite chez les rats hémine ($p < 0,01$).

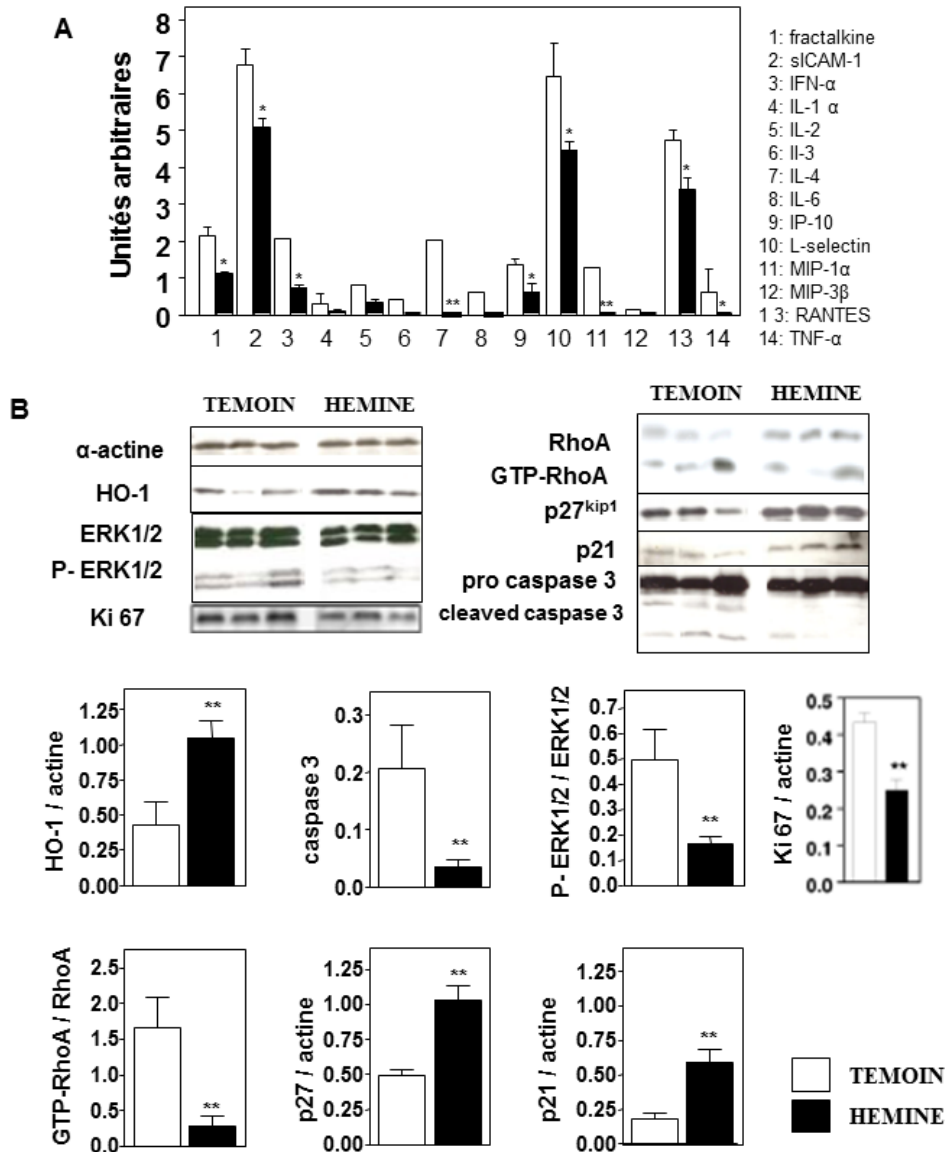


Fig. 23 : Effet du traitement par l'hémine sur l'expression protéique à J7. A : Expression des cytokines inflammatoires. **B :** Expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation, ainsi que dans la migration et l'apoptose. Chaque puits représente 1 rat.

Ces résultats suggèrent une plus faible prolifération et migration des cellules vasculaires en présence d'hémine, en accord avec les données morphologiques précédemment décrites.

Expression de l'HO-1 et des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire à J28 (Fig 24). L'induction de l'expression de l'HO-1 en réponse au traitement par hémine était toujours significativement augmentée chez les rats hémine ($p < 0,05$) ($n=5$) comparativement aux rats témoins ($n=5$). L'effet inhibiteur de l'hémine sur les voies impliquées dans la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses était toujours observé, mais de façon atténuée comparativement à J7. Les niveaux d'activation des protéines ERK1/2 et RhoA étaient significativement réduits d'un facteur 2 ($p < 0,01$) et d'un facteur 4 ($p < 0,05$) respectivement chez les rats hémine comparativement aux rats témoins. Concernant les cdki (p27^{kip1} et p21), leur expression avait une tendance non significative à être plus élevée chez les rats hémine. L'analyse du ratio caspase 3 activée/caspase 3 inactive révélait une absence de différence entre les deux groupes, suggérant une réduction importante de l'apoptose cellulaire comparativement à J7.

3.3.1.EFFET DE EP224283 SUR L'EXPRESSION DES PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA RESTENOSE

EP224283 étant un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, un inhibiteur non sélectif de $\alpha_v\beta_3$ impliquée dans la prolifération, et un inhibiteur du facteur Xa, nous avons émis l'hypothèse que la réduction de l'hyperplasie intimale observée était liée à la réduction des différentes voies de la prolifération, particulièrement les voies PDGF dépendantes.

Expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire à J7 (Fig. 25). Les résultats montraient ($n=5$ rats/groupe), une réduction significative de l'activation des protéines impliquées dans les deux voies de prolifération stimulées par le PDGF - phospho-ERK1/2 et phospho-Akt^{THR308} - chez les rats EP224283 comparativement aux rats témoins ($p < 0,001$ et $p < 0,01$ respectivement). La phosphorylation de la protéine p38 MAPK, impliquée dans la réduction de la prolifération via une augmentation d'expression de p27^{kip}, était significativement augmentée chez les rats EP224283 ($p < 0,05$), soulignant son effet antiprolifératif. Enfin, l'expression de la protéine Ki-67, marqueur de la prolifération cellulaire, était significativement réduite chez les rats EP224283 comparativement aux témoins ($p < 0,01$). En revanche, nous

n'avons pas mis en évidence d'augmentation significative des protéines régulatrices de la prolifération, p21 et p27. Aucun effet sur l'expression de l'HO-1 n'était observé.

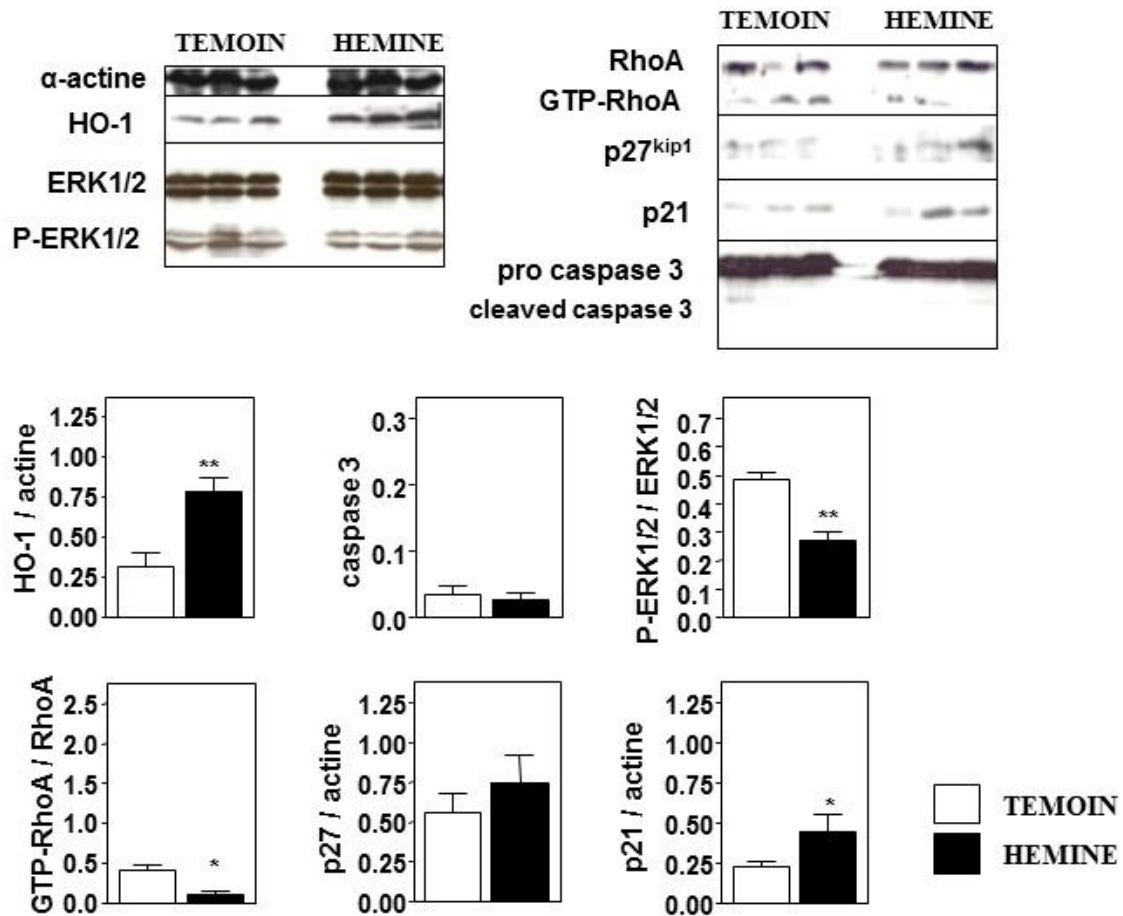


Fig. 24 : Effet du traitement par hémine à J28 sur l'expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation, ainsi que sur la migration et l'apoptose. Chaque puits représente 1 rat. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire à J28 de l'implantation du stent et du traitement par EP224283 (Fig. 26). Les résultats montraient à 28 jours la même tendance qu'observée à 7 jours de l'implantation, mais avec une atténuation de l'ensemble des réponses, la différence entre les deux groupes ($n=3$ rats/groupe) n'étant plus significative. Ce phénomène peut s'expliquer par l'implication précoce de la stimulation par le PDGF et du syndrome inflammatoire dans les mécanismes de resténose.

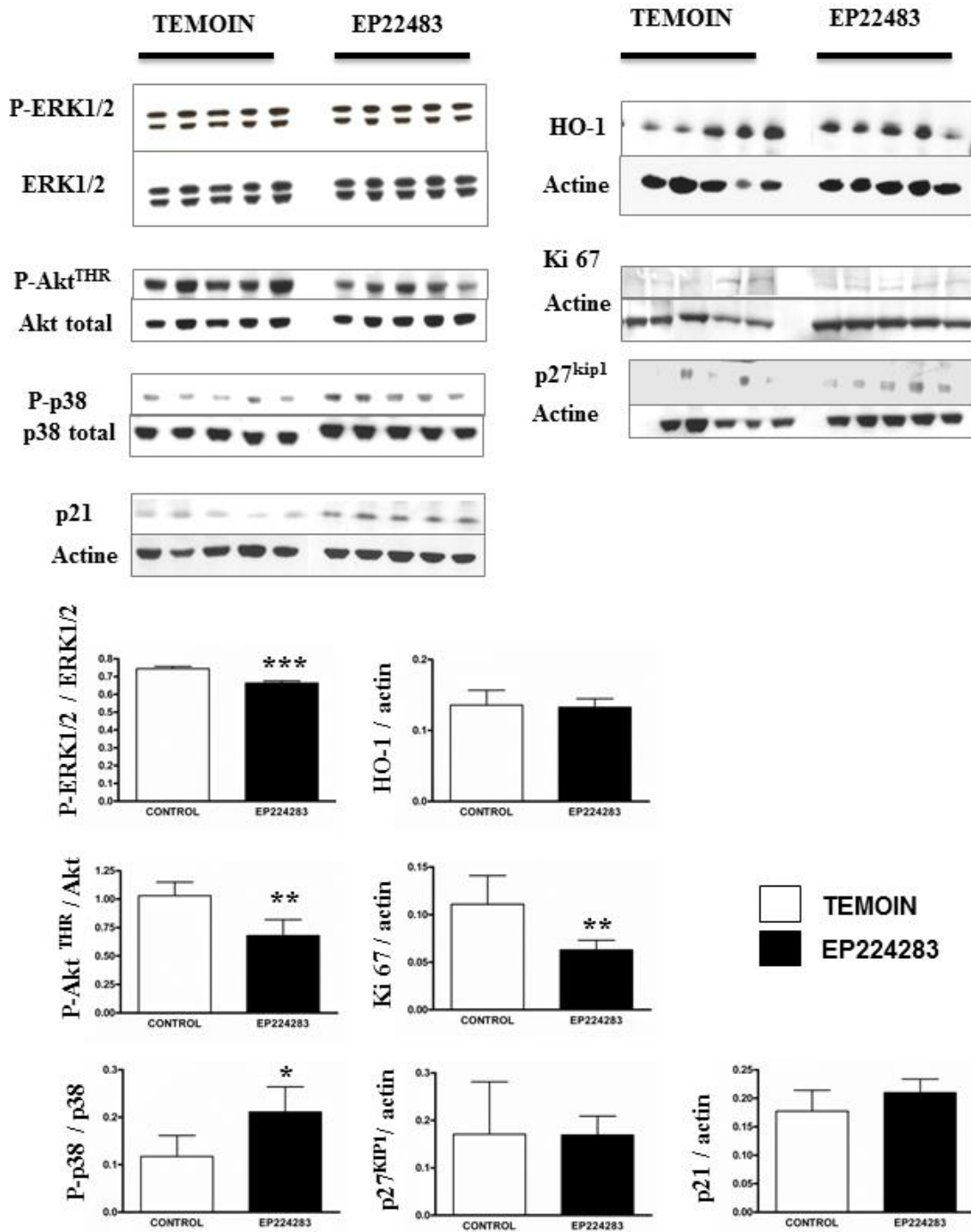


Fig. 25 : Effet du traitement par EP224283 à J7 sur les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation. Chaque puits représente un rat. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

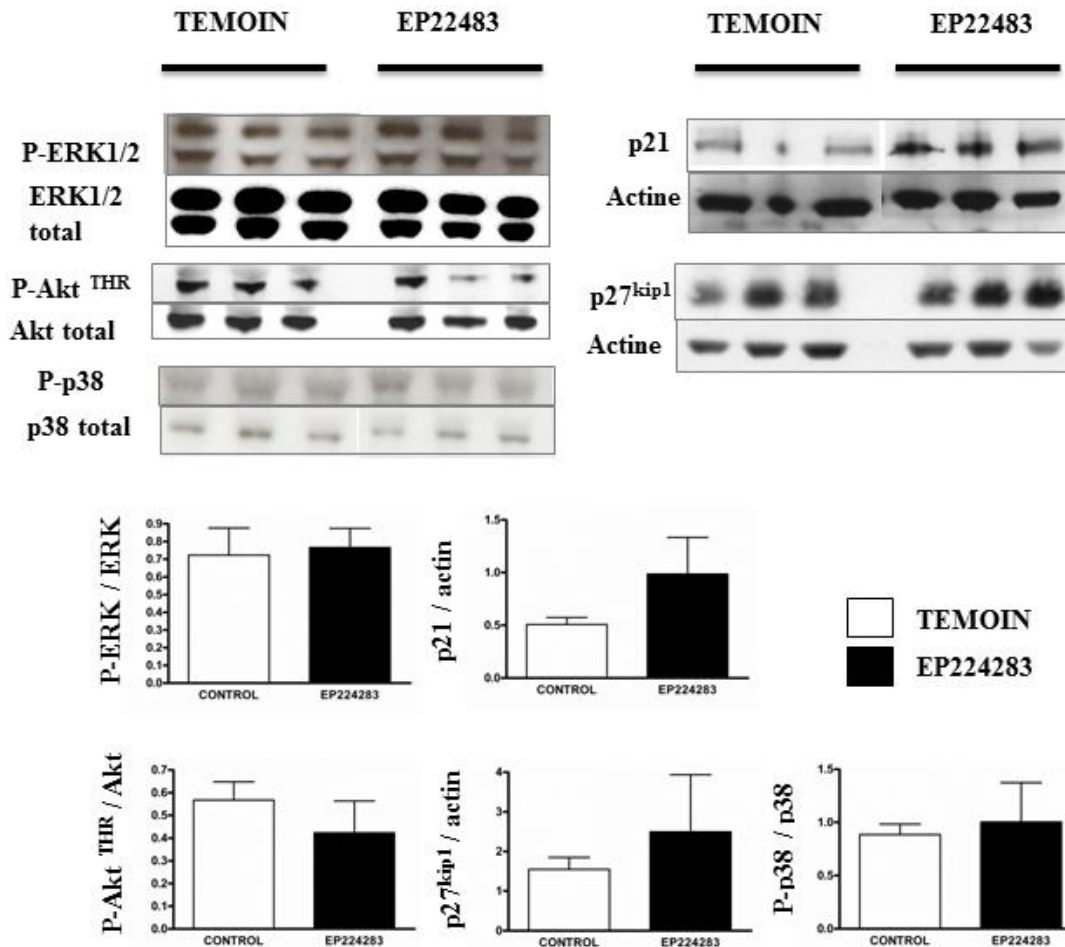


Fig. 26 : Effet du traitement par EP224283 à J28 sur les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et dans sa régulation montrant une atténuation des mécanismes de prolifération dans les 2 groupes comparativement à J7. Chaque puits représente un rat.

3.4.ROLE DE L'HEME OXYGENASE-1 ET DE L'ACTION ANTI GP IIb / IIIA DANS LA PROTECTION CONTRE LA RESTENOSE INTRA-STENT

3.4.1.ROLE DE L'HEME OXYGENASE-1 ET DE SES PRODUITS DE DEGRADATION

Effets d'un inhibiteur compétitif de l'HO-1. Afin de vérifier le rôle l'HO-1 dans les effets induits par l'hémine, nous avons effectué une étude morphométrique d'aortes stentées pour mesurer les effets d'un inhibiteur compétitif de l'HO-1, l'étain protoporphyrine IX (SnPP). En présence de SnPP (25 mg/Kg/48h), l'hémine (25 mg/Kg/48h) n'induisait pas de régression de la néointima par rapport au groupe témoin, mais au contraire le ratio n/m était augmenté de 20%

(ratio n/m de $0,85 \pm 0,05$ dans le groupe SnPP + hémine (n=4) versus $0,70 \pm 0,03$ dans le groupe témoin (n=3)). Nous avons également recherché le rôle de l'HO-1 induite uniquement par le stress vasculaire lié à la mise en place du stent en traitant des rats par du SnPP (15 mg/kg/48h) seul. Dans ce groupe (n=3), la formation de néointima était significativement augmentée de 21% ($p < 0,05$) (ratio n/m égal à $0,85 \pm 0,02$) par rapport au groupe témoin précédent (Fig. 27). Ces résultats confirment que l'effet de l'hémine observé est en rapport avec l'induction de l'HO-1.

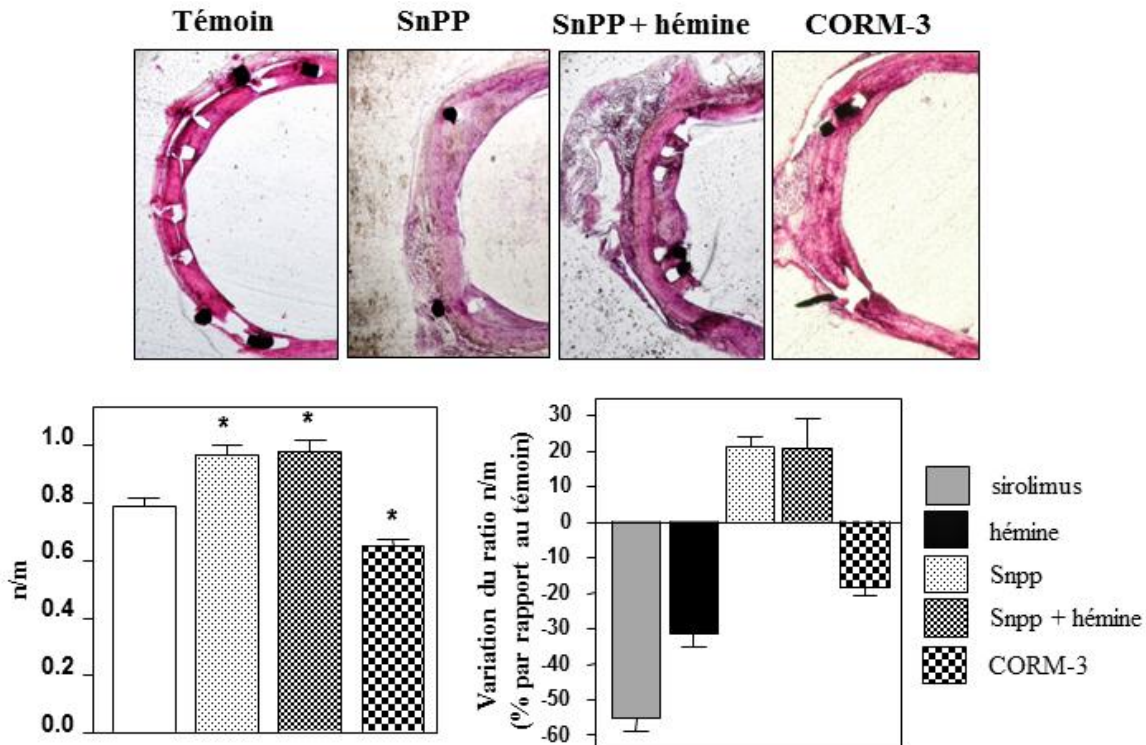


Fig. 27 : Effet de l'inhibition de l'HO-1 (SnPP) et d'un donneur de CO sur le développement de la resténose intra-stent par analyse histomorphométrique. Sections d'aortes stentées caractéristiques par groupe, et représentation de l'hyperplasie intimale par la mesure du ratio n/m. * $p < 0,05$.

Effets d'une molécule libératrice de monoxyde de carbone. L'activité de l'HO-1 conduit à la production de CO et de biliverdine/bilirubine. Afin d'identifier le rôle du CO dans les effets protecteurs de l'hémine, nous avons analysé par une étude morphométrique les effets d'un traitement chronique avec le CORM-3 (30 mg/Kg/48h), un donneur exclusif de CO. Chez les rats traités avec le CORM-3 (n=5), le ratio n/m était de $0,58 \pm 0,01$, alors qu'il était de $0,70 \pm 0,03$ dans le groupe témoin (n=3). La formation de néointima était donc significativement diminuée de

19% ($p < 0,05$) par le traitement CORM-3. Ce résultat confirme le rôle majeur de la libération de CO dans l'action de l'hémine que nous avons observé (Fig. 27).

3.4.2.ROLE DU MECANISME ANTI GP IIb / IIIa DANS LA RESTENOSE

Afin de déterminer parmi les deux sites actifs de la molécule EP224283 (le tirofiban et l'idraparinux) lequel est principalement responsable de la réduction de l'hyperplasie néointimale, nous avons effectué une analyse histomorphométrique à J28 chez des rats traités par EP37122, qui est une molécule identique à EP224283 mais sans la molécule de tirofiban. La quantification de la néointima par le ratio n/m était égale à $1,04 \pm 0,14$ ($n=9$) chez les rats témoins. Le ratio n/m des rats EP37122 ($n=9$) était sensiblement réduit, égal à $0,91 \pm 0,06$, mais aucune différence significative entre les deux groupes n'était mise en évidence. Aucune sténose n'était visualisée chez les rats EP37122. Ces résultats sont en faveur d'un effet anti-prolifératif limitant la resténose provenant majoritairement du site tirofiban de la molécule EP224283, ou d'un effet coopératif entre les deux molécules (Fig. 28).

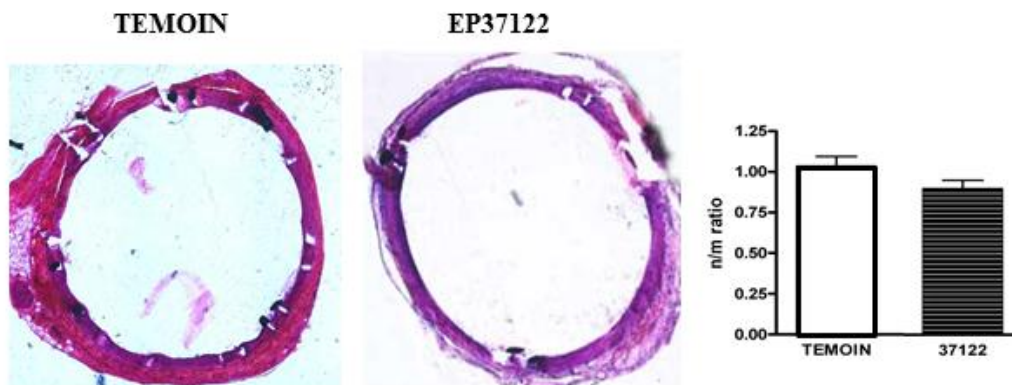


Fig. 28 : Effet d'un traitement par EP37122, contenant uniquement une biotine et la molécule idraparinux, sur la resténose à J28. Coupes transversales caractéristiques de chaque groupe et quantification du ratio néointima/média (n/m) ne mettant pas en évidence de différence significative entre les deux groupes.

3.5.EFFET IN VITRO DES MOLECULES ETUDIEES SUR LA VIABILITE CELLULAIRE

3.5.1.EFFET DE L'HEMINE

Afin de tester l'influence directe de l'hémine sur la viabilité des cellules musculaires lisses (HCASMCs) et endothéliales (HCAECs), nous avons *in vitro* traité ces deux types cellulaires avec des concentrations croissantes d'hémine. Les résultats montraient que l'hémine n'entraîne pas d'altération de la viabilité des cellules endothéliales, y compris à de fortes concentrations (100 μ M). De même, avec les cellules musculaires lisses, l'hémine ne montrait pas non plus d'altération significative de la viabilité, même si une sensible altération était constatée à partir d'une concentration de 10 μ M. Ces résultats sont en faveur de l'absence de cytotoxicité directe de l'hémine sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, ce qui permet d'envisager un largage local de l'hémine par un stent sans risque de cytotoxicité sur les cellules endothéliales et musculaires lisses (Fig. 29).

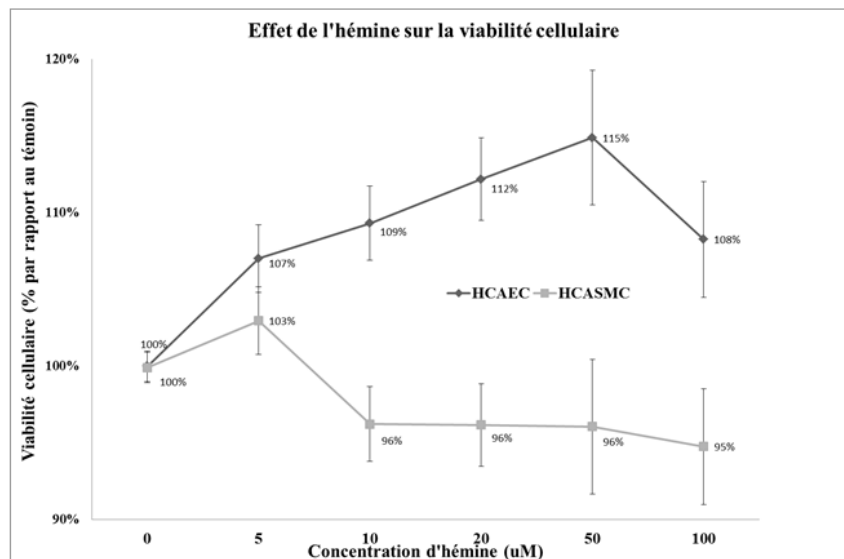


Fig. 29 : Effet *in vitro* de concentrations croissantes d'hémine sur la viabilité des cellules endothéliales et musculaires lisses.

3.5.2.EFFET DE EP224283

Nous avons également testé l'influence directe de EP224283 sur la viabilité des cellules musculaires lisses (HCASMC) et endothéliales (HCAEC). Les résultats étaient semblables entre

les deux lignées cellulaires et montraient une inhibition dose dépendante de la viabilité entre 5mg/ml et 15 mg/ml de EP224283. A la concentration de 15 mg/ml, la prolifération cellulaire était réduite à 70%. La concentration cytotoxique requise pour réduire de 50% la prolifération cellulaire (CC50) étant obtenue avec des concentrations supérieures à 15 mg/ml pour les 2 types cellulaires HCASMC et HCAEC. Ces résultats montrent d'une part que EP224283 inhibe partiellement la prolifération cellulaire *in vitro* des cellules endothéliales et musculaires lisses, et d'autre part que sa concentration cytotoxique est très élevée (Fig. 30).

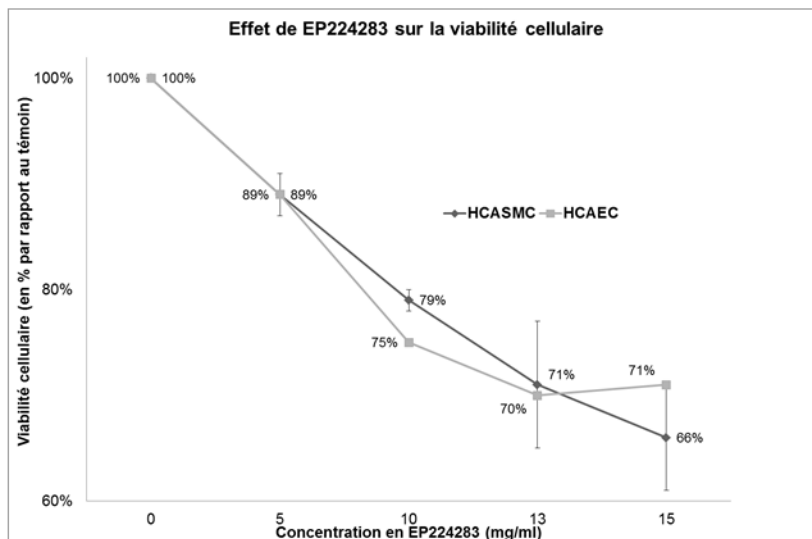


Fig. 30 : Effet *in vitro* de concentrations croissantes de EP224283 sur la viabilité des cellules endothéliales et musculaires lisses.

4. DISCUSSION

Les stents actifs actuellement commercialisés et utilisés en thérapeutique humaine réduisent la resténose en délivrant localement des drogues cytotoxiques ou cytostatiques *via* un polymère permanent. Ces stents actifs sont associés à un risque accru de thrombose aigüe tardive surtout en cas d'arrêt de la bithérapie antiagrégante plaquettaire [122]. Ce risque est en rapport d'une part avec une cicatrisation incomplète ou très retardée de la paroi vasculaire, et d'autre part à de possibles réactions d'hypersensibilité au polymère [105]. Au cours de ces travaux, nous avons démontré un effet bénéfique de deux nouvelles molécules thérapeutiques, l'hémine et EP224283, pour réduire la resténose intra stent. **L'administration chronique d'hémine**, inducteur de l'hème oxygénase-1 (HO-1), permet une réduction de 30% de la formation de néointima chez le rat. Ce résultat est confirmé avec le modèle classiquement utilisé de lapin

hypercholestérolémique par une réduction de plus de 40%. Point essentiel, nos travaux en microscopie électronique démontrent que la réduction de l'hyperplasie néointimale par un traitement chronique à l'hémine n'altère pas la ré-endothélialisation des mailles du stent, ce qui devrait permettre de limiter les risques de thrombose aiguë tardive par retard de cicatrisation. Les effets observés liés à l'induction de l'HO-1 sont une limitation de la réaction inflammatoire, un effet anti-apoptotique et un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses. Nos travaux avec un donneur exclusif de monoxyde de carbone (CO) suggèrent qu'une grande partie de ces mécanismes sont liés à la libération de CO endogène lors de l'activation de l'HO-1 [192].

L'administration chronique de EP224283, un nouvel agent antithrombotique combinant une activité anti facteur Xa par la molécule idraparinux reliée par une biotine à la molécule tirofiban anti GP IIb/IIIa, permet une réduction de 20% de la formation de néointima chez le rat. Cet effet, lié en majorité à l'activité du tirofiban comme démontré par nos travaux, s'exerce principalement *via* l'inhibition partielle des voies de prolifération cellulaires stimulées par les facteurs de croissance tels que le PDGF [193]. De plus, grâce à sa biotine, EP224283 se lie fortement à l'avidine, ce qui permet d'envisager sa fixation sur un stent lui-même fixé avec de l'avidine, sans utilisation de polymère. Cela permettrait d'éviter les réactions d'hypersensibilité liées au polymère, mais nécessite une étude de faisabilité. Enfin, par sa double action anti-thrombotique et anticoagulante, EP224283 pourrait également permettre de limiter les risques de thrombose aiguë et donc la nécessité d'un double traitement antiagrégant systémique concomitant.

Nous avons étudié les effets de ces deux nouvelles molécules dans les modèles de resténose par implantation d'un stent dans l'aorte abdominale de rat et par implantation d'un stent dans les artères iliaques de lapins hypercholestérolémiques pour l'hémine. Le modèle de resténose chez le rat décrit par Lowe [150] permet un remodelage vasculaire suffisant pour étudier les variations d'hyperplasie néointimale en réponse à un traitement pharmacologique, comme démontré par la variation du ratio néointima/média lors de l'implantation d'un stent actif au sirolimus comparativement à un stent nu. De plus, ce modèle permet une étude approfondie des mécanismes cellulaires de signalisation impliqués grâce à une large gamme d'anticorps disponibles dans le commerce. En ce qui concerne le modèle du lapin hypercholestérolémique, il fait partie des 2 modèles les plus reconnus pour l'étude de la resténose, avec le modèle de stenting des artères coronaires de porc. Le lapin présente l'avantage, comparativement au porc, de

développer un retard de ré-endothélialisation après une lésion endothéliale, ce qui en fait un bon modèle pour l'évaluation de la ré-endothélialisation [151]. Compte tenu des propriétés pro-angiogéniques de l'HO-1 décrites dans la littérature [166, 175], nous avons utilisé ce modèle du lapin pour évaluer la ré-endothélialisation après implantation du stent et traitement par hémine.

Comme détaillé en introduction, l'HO-1 joue un rôle déterminant contre le stress vasculaire faisant suite entre autre à l'implantation d'un stent. Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser l'hémine comme inducteur de l'HO-1, car c'est un médicament possédant déjà l'autorisation de mise sur le marché en pathologie humaine (traitement de la porphyrie). Nous avons également détaillé en introduction que les plaquettes sont des effecteurs clefs de la resténose intra-stent et que le polymère utilisé peut avoir des effets néfastes. Nous avons donc choisi de tester EP224283 pour son effet anti plaquettaire puissant combiné à un effet anti Xa via une biotine qui pourrait permettre une imprégnation sans polymère sur un stent et une réduction des thromboses aiguës de stent.

4.1. DISCUSSION DES EXPERIMENTATIONS SUR L'HEMINE

Nous avons démontré un effet limitant de l'hémine sur la resténose intra-stent chez le rat et avons confirmé cet effet chez le lapin hypercholestérolémique. Nous avons ensuite recherché un effet procicatrisant de cette molécule sur la paroi vasculaire en raison du rôle pro-angiogénique attribué à l'HO-1 dans la littérature [166, 175]. Notre analyse en microscopie électronique confirme que les cellules faisant l'interface avec le flux sanguin sont des cellules endothéliales aussi bien dans les groupes témoins que dans les groupes traités par l'hémine. De plus, la surface de recouvrement des mailles est équivalente dans les deux groupes. Ces résultats, principalement chez le lapin qui est un bon modèle d'étude de la ré-endothélialisation, sont en faveur d'une cicatrisation de la paroi vasculaire après implantation du stent y compris chez les animaux traités par l'hémine, en plus de l'effet limitant la prolifération cellulaire. L'endothélium observé semble être fonctionnel car aucun thrombus n'a été mis en évidence. La ré-endothélialisation du stent est un phénomène important car elle permet d'éviter le risque de thrombose aiguë du stent, et de limiter la durée d'une bithérapie antiagrégante potentiellement dangereuse. La ré-endothélialisation fonctionnelle du stent en présence d'hémine est en accord avec les données de la littérature. Il a en effet été montré que l'hémine améliore la dysfonction endothéliale en

rapport avec l'insulino résistance [175], et que l'HO-1 a une activité pro-angiogénique *via* une stimulation de la production du SDF-1 [166]. Le SDF-1 est un important régulateur de la circulation et du recrutement des progéniteurs endothéliaux circulants. Les progéniteurs endothéliaux circulants étant les cellules permettant la ré-endothélialisation lors de la cicatrisation de la paroi vasculaire.

Notre étude de l'analyse des profils protéiques à 7 jours de l'implantation du stent montre une production importante de cytokines et chemokines inflammatoires, en accord avec la littérature [188]. Dans nos travaux, l'hémine permet une réduction significative de la production des cytokines, notamment IL-6 et INF α , impliquées dans l'activation et l'agrégation plaquettaire, ainsi que dans le recrutement des monocytes et des macrophages. C'est précisément cette étape inflammatoire qui joue un rôle majeur dans la phase précoce de la resténose, conduisant à la libération de facteurs de croissance tels que le PDGF. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Kapturczak *et al.* [194] qui ont observé chez des souris knock-out pour le gène *ho-1* des réactions inflammatoires exagérées, indiquant le rôle majeur de l'HO-1 dans la résolution de la phase précoce de l'inflammation. Cet effet anti-inflammatoire de l'hémine explique, au moins en partie, son effet bénéfique à la phase précoce de la resténose. Conjointement à cet effet anti-inflammatoire, le traitement par hémine entraîne une réduction de l'activation de la protéine ERK1/2, dont le rôle majeur dans les mécanismes de remodelage de la paroi vasculaire a déjà été démontré [195]. Dans nos travaux, la concentration des facteurs inhibiteurs de la prolifération (p27^{kip1}, p21) est significativement plus élevée dans le groupe hémine. Ces résultats sont en accord avec l'étude de Duckers *et al.* [196] qui a montré un effet anti-prolifératif de l'HO-1 sur les cellules musculaires lisses après lésion d'angioplastie *via* une augmentation de la concentration de p21. Notre étude montre également que l'hémine réduit l'activation de la protéine G monomérique RhoA, reconnue pour son implication dans la migration des cellules vasculaires. Ces résultats sont en faveur d'un rôle limitant de l'hémine sur la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses.

Enfin, nos travaux montrent une réduction de la forme active de la caspase 3 lors du traitement par hémine, en faveur d'un effet anti-apoptotique important. Cet effet est connu, mis en évidence par Brouard [162] dont les travaux démontrent que l'effet anti-apoptotique de l'HO-1 s'exerce par la régulation du taux de fer intracellulaire, par la libération de CO et par l'activation de la

protéine p38 MAPK. D'autre part, l'apoptose précède la prolifération cellulaire et il est proposé que la modulation de l'apoptose agisse sur la prolifération des cellules survivantes environnantes.

L'ensemble des effets bénéfiques de l'hémine sur le développement de la resténose est dépendant de l'induction de l'HO-1. En effet, l'administration d'un inhibiteur compétitif de l'HO-1 (l'étain protoporphyrine IX), associé ou non à l'administration d'hémine, a un effet néfaste sur la resténose, entraînant une majoration de 20% du remodelage vasculaire par rapport aux rats témoins. De plus, l'augmentation du ratio n/m dans ce groupe comparativement au groupe témoin suggère le rôle déjà important de l'induction naturelle de l'HO-1 en réponse à l'implantation du stent. Ces résultats sont en accord avec des études cliniques suggérant un lien entre la présence d'une anomalie génétique du gène de l'HO-1 entraînant une diminution de son expression et l'augmentation des phénomènes de resténose intra-stent au niveau coronarien [169, 170].

Les produits de dégradation de l'HO-1 sont la bilirubine et le CO. Afin de déterminer le rôle de ces deux molécules dans l'effet bénéfique observé sur la resténose, nous avons réalisé une étude morphométrique après implantation d'un stent et traitement avec un donneur exclusif de CO, le CORM-3. Nos résultats montrent une réduction du ratio n/m de 20% dans le groupe CORM-3 ce qui suggère un rôle important du CO dans la limitation de la formation de la néointima. Ces données sont en accord avec l'étude d'Otterbein [161] dont les travaux illustrent le rôle antiprolifératif du CO sur les cellules musculaires lisses via l'activation de p38 MAPK. Un effet anti-inflammatoire [160] et anti-apoptotique du CO [162] est également mis en évidence.

Toutefois, en pratique clinique, l'hémine ne s'administre actuellement que difficilement par perfusion lente intraveineuse et peut avoir des effets secondaires hépatotoxiques lors d'administration de fortes doses [197]. Son administration au long cours lors de l'implantation d'un stent ne s'envisage donc que localement, *via* un stent actif libérant de l'hémine. Nos travaux *in vitro* sur la viabilité cellulaire en présence d'hémine montrent qu'une administration locale est possible, sans toxicité intrinsèque de l'hémine. En revanche, les modalités de fixation de l'hémine sur un stent, compte tenu de sa taille, et le polymère à utiliser, afin de limiter les réactions d'hypersensibilités, sont actuellement en cours d'étude.

4.2.DISCUSSION DES EXPERIMENTATIONS SUR EP224283

Le rôle majeur des plaquettes dans la resténose intra stent est actuellement admis. Une effraction de l'endothélium vasculaire entraîne l'exposition de facteurs thrombogéniques sous endothéliaux entraînant l'activation plaquettaire [198, 199]. Les plaquettes se fixent ensuite sur le site de l'effraction par leurs récepteurs GP IIb / IIIa à la fibronectine sous endothéliale. Dans cet environnement pro-inflammatoire, les plaquettes sécrètent alors une forte quantité de molécules pro-inflammatoires et facteurs de croissances, tels que le PDGF, impliqués dans le changement de phénotype des cellules musculaires lisses [81]. Il semble également que l'expression plaquettaire de la P-selectine joue un rôle déterminant dans l'augmentation des cytokines inflammatoires et de l'hyperplasie néointimale après une effraction artérielle [200]. Nos résultats sont en accord avec la littérature sur le rôle princeps des plaquettes. En effet, nous démontrons que EP224283 réduit l'hyperplasie néointimale principalement par son site d'action anti GP IIb / IIIa, les expériences effectuées avec EP37122, qui ne possède pas la partie anti GP IIb / IIIa, ne montrant pas d'effet de cette molécule sur l'hyperplasie intinale.

Des stents imprégnés d'abciximab Ac thérapeutique, une autre molécule anti GP IIb / IIIa, sont déjà testés chez le porc et chez l'homme. Une réduction du taux d'hyperplasie néointimale évalué en coronarographie à 50% a été observée (28% de resténose chez les témoins et 14% après implantation d'un stent actif abciximab) [148]. Dans notre étude, EP224283 inclut une autre molécule anti GP IIb / IIIa, le tirofiban, qui a démontré des propriétés similaires à l'abciximab sur la réduction des épisodes ischémiques lors des procédures endovasculaires coronariennes [201]. Toutefois, le tirofiban, contrairement à l'abciximab, est un inhibiteur non spécifique de $\alpha_v\beta_3$, impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire. Ainsi, les résultats des stents actifs imprégné d'abciximab sont encourageants pour nos travaux, mais ne peuvent être transposés directement au tirofiban.

Comme détaillé en introduction, le PDGF induit la prolifération des cellules musculaires lisses par une action sur la progression du cycle cellulaire *via* deux cascades de signalisation cellulaire, l'une passant par la PI3k/Akt, et l'autre par ERK1/2 [90]. Nos résultats sur l'analyse de l'expression protéique après traitement chronique par EP224283 sont en accord avec la littérature. Ils montrent en effet que EP224283 réduit l'activation des deux voies de prolifération

des cellules musculaires lisses, par une réduction de phosphorylation de ERK1/2 et de Akt. Au contraire, la forme phosphorylée de la protéine p38 MAPK, impliquée dans la réduction de la prolifération cellulaire [96], est significativement plus élevée en présence de EP224283. Cet effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire est confirmé par la réduction d'expression de Ki-67, marqueur de prolifération, dans le groupe traité à EP224283.

Plusieurs études expérimentales montrent qu'un stent imprégné d'héparine réduit sa thrombogénicité [142, 143]. Chez l'homme, l'étude HOPE montre que l'implantation d'un stent imprégné à l'héparine (HEPCOAT) permet d'éviter la bithérapie antiagrégante post implantation, puisque l'administration d'aspirine seule est suffisante. Ce résultat est primordial compte tenu des effets délétères liés à une bithérapie antiagrégante au long cours [186]. Dans notre étude nous n'avons pas évalué l'effet de EP224283 sur la thrombose, car des travaux sont déjà publiés sur différents modèles de thrombose artérielle chez la souris et démontrent un effet anti-thrombotique puissant de EP224283, supérieur à une administration conjointe d'idraparinux et de tirofiban [178]. Toutefois, il sera intéressant dans de futurs travaux de tester directement la thrombogénicité d'un stent imprégné de EP224283, qui pourrait probablement aussi permettre une réduction du traitement antiagrégant systémique complémentaire.

En plus d'un effet anti-thrombotique, les stents imprégnés d'héparine ont un effet antiprolifératif chez le porc [144, 145]. Dans des études cliniques, l'administration systémique d'héparine n'a pas d'effet sur la resténose [202, 203], alors qu'une administration locale lors de la pré-dilatation permet une réduction du taux de resténose à 6 mois [204]. Dans nos travaux, une administration systémique de la molécule anti Xa EP37122 n'a pas montré d'effet sur la resténose. Ce résultat peut s'expliquer, d'après la littérature, par le fait qu'une forte dose locale d'héparine est nécessaire pour obtenir un effet antiprolifératif.

D'après ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un stent imprégné de EP224283, permettant une forte concentration locale de la molécule de façon chronique, pourrait combiner effets anti-thrombotiques et anti-prolifératifs, entraînant un effet bénéfique à la fois sur la resténose et sur la thrombose de stents. Nos travaux *in vitro* sur la viabilité cellulaire endothéliale et musculaire lisse en présence de EP224283, montrent que seule une dose très élevée peut avoir des effets cytotoxiques (>15mg/ml) sur ces deux lignées cellulaires, autorisant ainsi une fixation

sur un stent sans cytotoxicité en deçà de ce seuil. Si les polymères permanents ou résorbables actuels peuvent provoquer des réactions d'hypersensibilité néfastes sur la thrombose [105], la forte liaison avidine / biotine pourrait permettre l'imprégnation d'un stent à EP224283 sans utilisation de polymère afin d'éviter ces réactions néfastes. La fixation au stent par la partie biotine de EP224283 laisserai ses 2 sites actifs libres. Des travaux en cours dans notre laboratoire montrent que l'avidine se fixe de façon covalente sur une surface chrome-cobalt, matériau utilisé pour la fabrication des stents de dernière génération.

4.3.LIMITES DE CES TRAVAUX

L'administration systémique des drogues testées est une des limites de nos travaux. Il était toutefois nécessaire de réaliser une première évaluation des ces deux nouvelles drogues afin de déterminer l'intérêt de les imprégner sur un stent. Les résultats obtenus après cette première étape vont conduire à de futurs travaux visant à étudier le mode d'imprégnation et l'évaluation d'une administration locale de ces deux nouvelles molécules par un stent.

Une seconde limite est le modèle animal utilisé, surtout avec la molécule EP224283 pour laquelle seul le modèle du rat était utilisé. Ce modèle permet toutefois une quantification reproductible et fiable de la néointima, et outre sa facilité de mise en œuvre, permet aussi une étude des mécanismes cellulaires impliqués plus approfondie que chez d'autres espèces. Nous avons principalement utilisé le modèle du lapin lors de nos travaux sur l'hémine pour étudier de façon approfondie la ré-endothélialisation.

5.CONCLUSION

Nos travaux démontrent le rôle de 2 nouvelles molécules dans la réduction de la resténose intra-stent : l'hémine et EP224283. Plus précisément, l'effet de l'hémine est lié à l'induction de l'HO-1 et à la libération de ses produits de dégradation, principalement le CO. Contrairement aux stents actifs actuels, en plus de la réduction de la prolifération, l'hémine permet une ré-endothélialisation des mailles du stents comparable à celle d'un stent inerte, ce qui permet de réduire le risque de thrombose aigüe tardive. L'effet observé avec EP224283 s'exerce lui principalement par son activité anti GP IIb / IIIa, mais son action combinée avec une molécule

Étude *in vivo* de nouvelles molécules thérapeutiques

anti facteur Xa lui confère un fort potentiel anti-thrombotique avec également un intérêt majeur pour la réduction du risque de thrombose de stent et pour l'allègement de la thérapie antiagrégante systémique concomitante à l'implantation d'un stent. Ces deux molécules ouvrent donc des perspectives thérapeutiques dans le cadre des recherches actuelles sur le développement de nouveaux stents actifs limitant la resténose sans majorer le risque de thrombose.

CHAPITRE 3 :
MODELES D'ETUDE *EX VIVO*
DE LA RESTENOSE INTRA-STENT

1. INTRODUCTION

Comme nous l'avons détaillé dans le premier chapitre, les modèles animaux sont actuellement incontournables pour l'étude de la resténose intra stent. Toutefois, ces modèles animaux présentent plusieurs limitations.

Pour plusieurs raisons, il n'existe pas de modèle animal fiable pour l'étude de la réponse vasculaire obtenue chez l'homme : les délais de réponse cellulaire et de cicatrisation pariétale sont différents et allongés chez l'Homme ; la réponse animale au traumatisme vasculaire est plutôt hyperplasique avec peu de collagène alors que chez l'Homme elle est plutôt hypocellulaire avec une matrice extracellulaire abondante ; les artères testées chez l'animal sont souvent saines alors que 70% du stent chez l'Homme est en contact avec la plaque d'athérome [153]. Par conséquent, plusieurs thérapeutiques testées avec succès chez l'animal ont échoué chez l'Homme. Ceci peut également s'expliquer par une dose thérapeutique ou une durée d'administration inadéquates ; une puissance statistique inadaptée ; et enfin par une focalisation sur des cibles thérapeutiques qui seraient moins importantes chez l'homme que chez l'animal [75].

D'autre part, la réponse pariétale artérielle à l'implantation du stent varie selon que l'artère soit de type élastique (artères iliaques de lapin, aorte de rat) ou musculaire (artères coronaires et infra-poplités humaines) [151], et selon le site d'implantation (variations de flux, de forces de cisaillement, influence de l'activité contractile du myocarde pour les stents coronaires). Les résultats d'un site à l'autre ne sont donc pas totalement transposables.

De plus, les modèles animaux ne permettent pas une étude satisfaisante des stents actifs, en raison de l'impossibilité d'effectuer des prélèvements sanguins et tissulaires réguliers. Il est alors difficile de déterminer l'efficacité de la drogue imprégnée sur le stent, ainsi que sa vitesse de distribution et sa répartition tissulaire, ou même d'étudier la dégradation du polymère.

Enfin, l'expérimentation animale pose des questions d'ordre éthique et fait partie des problématiques sociétales indéniables actuellement.

Modèles d'étude *ex vivo*

Pour ces différentes raisons, un modèle d'étude *ex-vivo* de la resténose intra-stent serait un outil primordial, permettant d'expérimenter sur des prélèvements artériels humains, de comparer différents types artériels et d'analyser plus finement les stents actifs par de multiples prélèvements et par une étude des écoulements et des forces de cisaillement.

Dans la littérature, seul un modèle *ex vivo* statique d'étude de la resténose est décrit. Il consiste à mettre en culture des portions d'artères mammaires internes humaines stentées durant 28 jours, puis d'en effectuer une analyse morphométrique ou d'étudier les mécanismes protéiques impliqués. Pour valider ce modèle, les auteurs rapportent une absence d'hyperplasie intimale parmi les prélèvements artériels mis en culture mais non stentés, et une hyperplasie significative recouvrant les mailles du stent chez les artères stentées et mises en culture pendant 28 jours [154].

Toutefois, comme nous l'avons vu, les forces de cisaillements ont une influence majeure dans le développement de la plaque d'athérome [36, 37] et dans les phénomènes de resténose [119, 120]. Par conséquent un modèle d'étude statique semble très éloigné de la réalité alors qu'un système permettant le maintien d'un flux intra-artériel contrôlé semble plus physiologique. La mise en place d'un tel modèle d'étude nécessite de mettre au point un bioréacteur adapté et spécifique.

Un bioréacteur est un dispositif destiné à l'ingénierie tissulaire *in vitro* ou *ex vivo*. Il fournit un environnement contrôlé qui permet la croissance des tissus vivants utilisés pour l'expérimentation biomédicale. Une boîte de Pétri, par exemple, est le ~~le~~ bioréacteur le plus simple. Les fonctions d'un bioréacteur incluent l'ensemencement des cellules dans le réacteur, l'apport des nutriments nécessaires, l'évacuation des déchets, le conditionnement mécanique des tissus [205]. L'utilisation d'un bioréacteur permet la compatibilité des composants chimiques et biologiques, le contrôle environnemental, la facilité d'utilisation et la stérilisation.

Si différents modèles de bioréacteurs avec flux sont déjà utilisés, aucun n'est développé pour une étude approfondie de la resténose et de ses thérapeutiques potentielles. Des bioréacteurs avec flux sinusoïdaux sont utilisés pour l'analyse des forces de cisaillement sur les couches cellulaires vasculaires [206-208] ou directement sur les cellules endothéliales [209, 210], ainsi que pour l'analyse des flux [210].

Hypothèses de travail. A partir de la problématique animale et des résultats encourageants obtenus avec l'hémine sur la resténose avec les modèles *ex vivo* décrits précédemment (chapitre II), nous avons émis les hypothèses suivantes :

- Un traitement par hémine pourrait avoir un effet bénéfique contre la resténose dans un modèle d'étude *ex vivo* de tissus artériels humains (coronaires et infra poplités)
- Ce modèle d'étude statique de la resténose restant très éloigné de la réalité en raison de l'absence de flux circulant, le développement d'un bioréacteur pour l'étude *ex vivo* en condition hémodynamiques et biologiques semblables à l'Homme pourrait permettre une étude plus fiable des nouvelles thérapeutiques et stents actifs.

Afin de tester ces deux hypothèses, le but de ces travaux de thèse était : 1) de reproduire le modèle *ex vivo* statique décrit dans la littérature avec des prélèvements humains infra-poplités et coronaires afin d'étudier les effets de l'hémine dans ce modèle ; 2) d'améliorer ce modèle en développant un bioréacteur permettant l'étude *ex vivo* hémodynamique de la resténose.

Dès lors, mes objectifs étaient les suivants :

- reproduire le modèle *ex vivo* statique de resténose avec ajout d'hémine dans le milieu de culture pour en étudier les effets à 28 jours de l'implantation du stent par une analyse morphométrique
- concevoir, réaliser et valider un modèle d'étude *ex vivo* dynamique de resténose dans un bioréacteur ayant pour finalité de faciliter l'analyse de nouveaux stents actifs, de travailler sur des tissus humains et de limiter l'expérimentation animale.

2.ÉTUDE EX VIVO STATIQUE DES EFFETS DE L'HEMINE SUR DES ARTERES CORONAIRES ET INFRA-POPLITES STENTEES D'ORIGINE HUMAINE

2.1.MATÉRIEL ET MÉTHODES

Origine des prélèvements vasculaires. Les prélèvements tissulaires humains coronariens provenaient de cœurs explantés lors de transplantations cardiaques et les prélèvements tissulaires

humains d'artères tibiales antérieures étaient prélevés lors de prélèvements multi-organes. L'autorisation de prélèvement était déposée auprès de l'agence de biomédecine sous le numéro PFS08-006 et aucun prélèvement n'était effectué sans un consentement éclairé des familles. Au total, 8 artères coronaires et 10 artères tibiales antérieures étaient prélevées sur des donneurs différents. Parmi les 8 cœurs explantés prélevés, 5 étaient explantés pour cardiopathie ischémique sévère et 3 pour cardiomyopathie dilatée. Les artères tibiales antérieures étaient prélevées chez 7 hommes et 3 femmes (âge moyen 53 ans [29-73]), non artéritiques, et dont les facteurs de risques étaient le tabac (n=2) et l'hypertension artérielle (n=3).

Culture tissulaire. Notre protocole d'expérimentation était établi selon les travaux décrits dans la littérature [154]. Les artères étaient prélevées en conditions stériles et immédiatement plongées dans une solution physiologique (140 mM NaCl, 5,6 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 8 mM Hepes, pH 7,4), mises sur glace et transportées au laboratoire dans les heures suivantes. Après une dissection soigneuse sous microscope, chaque prélèvement était sectionné en segments de 20 mm puis stenté (stents inertes BX SONIC, Cordis[®], Johnson & Johnson, diamètre 3,5 ou 4 mm selon le diamètre artériel natif estimé et longueur 14 à 18 mm, diamètres et longueurs répartis de façon homogène entre les groupes). Les segments stentés étaient alors répartis dans des boîtes de culture 6 puits, immergés dans du milieu de culture (mélange volume à volume de milieu pour cellules endothéliales et musculaires lisses, Promocell, Heidelberg, Germany) supplémentés en pénicilline et streptomycine (50 UI/mL, PromoCell), et divisés aléatoirement en 3 groupes :

- un groupe témoin, dont les prélèvements étaient immergés dans du milieu de culture seul
- un groupe H30, pour lequel de l'hémine 30 µM était ajoutée au milieu de culture
- un groupe H100, pour lequel de l'hémine 100 µM était ajoutée au milieu de culture.

Dans chaque groupe l'un des prélèvements n'était pas stenté. Les boîtes de culture étaient ensuite maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée sous 5% de CO₂. Le milieu était changé 3 fois par semaine. En cas de contamination bactériologique, l'expérimentation était interrompu et les prélèvements exclus. Les doses d'hémine ajoutées au milieu étaient déterminées à partir des concentrations utilisées chez l'animal, une étude préliminaire ayant montré que la dose de 50 mg/kg/48h ip correspond à une concentration tissulaire artérielle d'hémine d'environ 30 µM.

Analyse morphométrique et étude de l'expression protéique. Vingt-huit jours après implantation du stent et mise en culture, les prélèvements étaient délicatement rincés au sérum physiologique, puis soit inclus en résine et analysés comme décrit dans le chapitre II (2.2.1), soit congelés pour analyse de l'expression protéique comme décrit dans le chapitre II (2.2.3).

Analyse statistique. Les paramètres étaient exprimés en moyenne et écart type. Pour la mesure du ratio néointima/média, 10 coupes réparties sur toute la longueur de chaque stent étaient sélectionnées puis moyennées et analysées selon le test ANOVA. Le logiciel GraphPad Prism 4 était utilisé et le seuil de significativité fixé à $p < 0,05$.

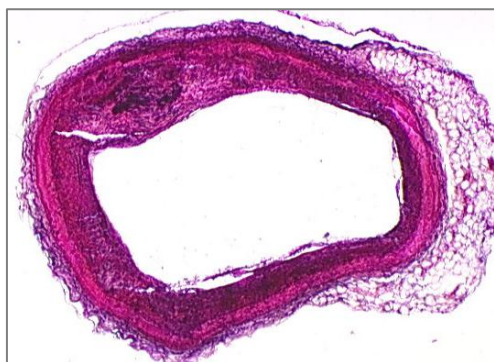
2.2. RÉSULTATS

Au total, parmi les prélèvements d'artère tibiale antérieure, 2 contaminations bactériennes sont survenues sur les 10 prélèvements. Parmi les 8 prélèvements restant, 4 étaient analysés en histomorphométrie et 4 étaient analysés par western blot. Parmi les prélèvements d'artères coronaires, 4 contaminations sont survenues sur 8, et les 4 prélèvements restants étaient analysés en histomorphométrie.

Analyse histomorphométrique. Nous n'avons pas réussi à reproduire le modèle décrit dans la littérature, car les analyses des artères coronaires et des artères tibiales antérieures n'ont pas mis en évidence d'hyperplasie néointimale. Les mailles des stents n'étaient pas incluses dans la paroi artérielle (Fig.31).



Fig. 31 : Grossissement x10 au contact d'une maille sur une coupe transversale d'artère coronaire du groupe témoin.



De plus, les prélèvements non stentés montraient un remodelage concentrique, probablement en raison de l'absence de flux circulant dans l'artère (Fig. 32).

Fig. 32 : Grossissement x 5 d'une artère coronaire du groupe témoin non stentée.

Analyse histomorphométrique des artères coronaires humaines. L'analyse de ces prélèvements était rendue extrêmement délicate par leur caractère pathologique. De plus, nous n'avons pas réussi à générer de l'hyperplasie néointimale, que ce soit avec les artères coronaires témoins ou lors de l'ajout d'hémine dans le milieu de culture.

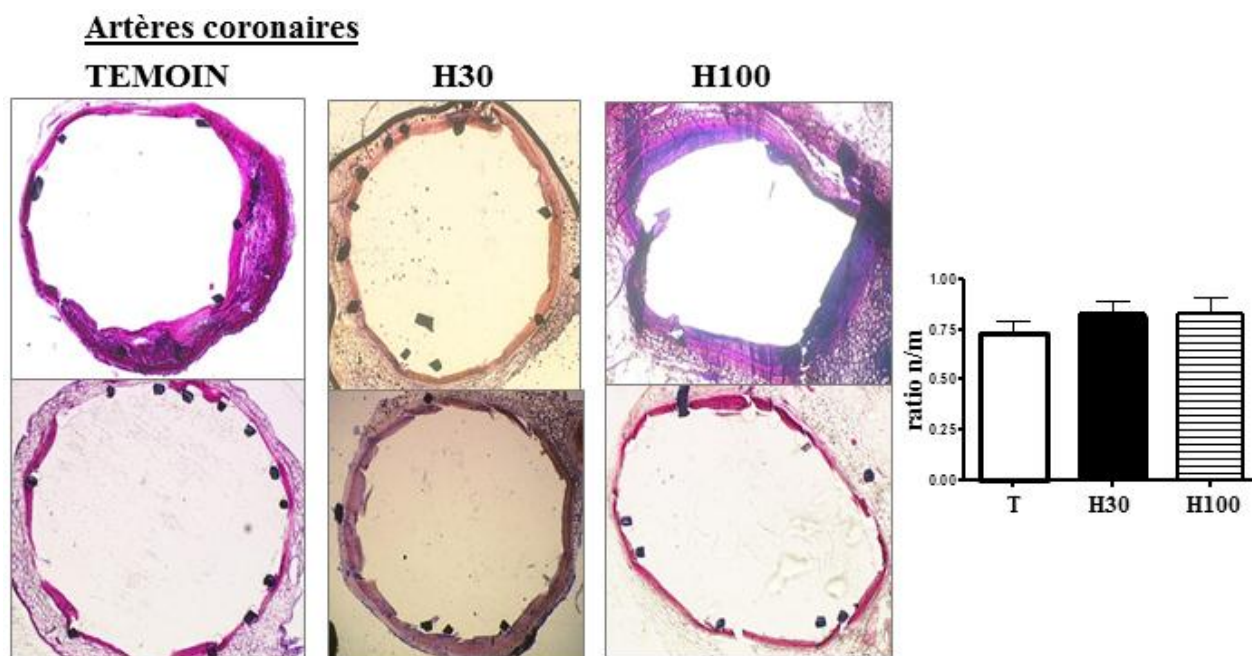


Fig. 33 : Sections transversales caractéristiques d'artères coronaires et analyse morphométrique.

Au total, le ratio néointima/média (n/m) du groupe témoin était de $0,74 \pm 0,15$, sans différence significative avec les groupes traités à l'hémine 30 μ M (H30) dont le ratio n/m était de $0,81 \pm$

0,14, ni avec le groupe traité à l'hémine 100 μ M (H100) dont le ratio n/m était de $0,82 \pm 0,2$ (Fig. 33).

Analyse histomorphométrique des prélèvements d'artère tibiale antérieure. L'analyse des artères tibiales antérieures était plus simple qu'avec les artères coronaires, en raison de leur caractère sain. Toutefois, nous n'avons pas constaté d'hyperplasie néointimale ou très peu, et les mailles du stent n'étaient pas recouvertes. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence de différence significative entre les groupes. Le ratio n/m du groupe témoin était de $0,55 \pm 0,14$; le ratio n/m du groupe H30 était sensiblement abaissé de façon non significative à $0,44 \pm 0,1$; et le ratio n/m du groupe H100 était de $0,54 \pm 0,17$ (Fig.34).

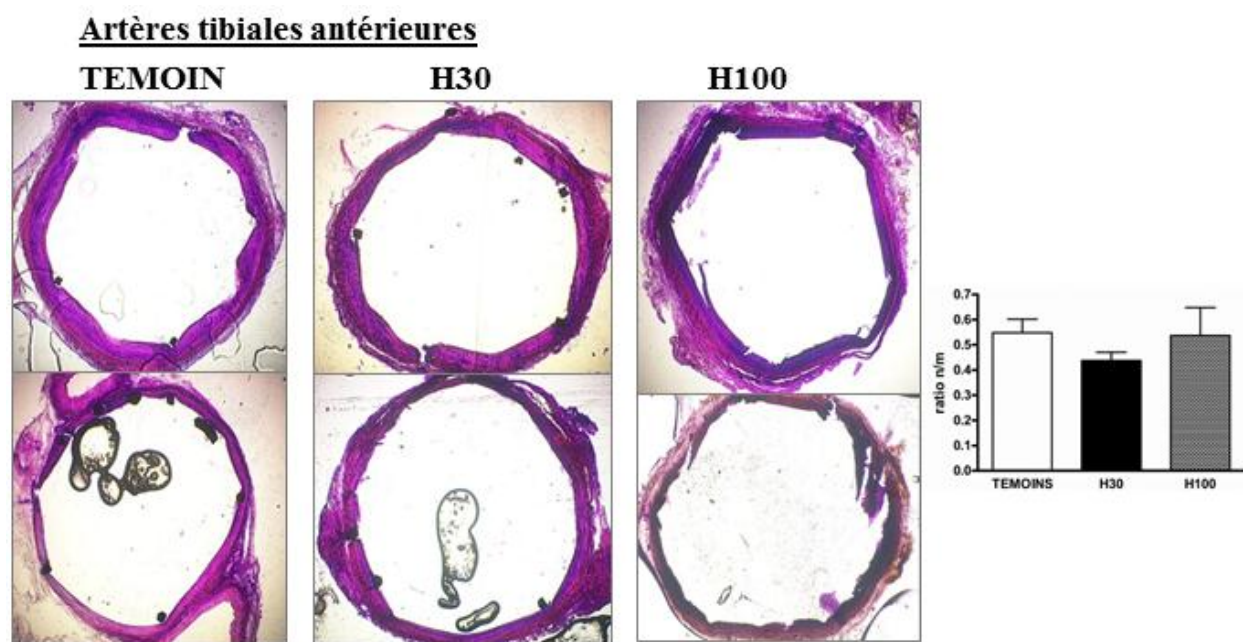


Fig. 34 : Sections transversales caractéristiques d'artères tibiales antérieures et analyse morphométrique par groupe.

Compte tenu de l'absence de résultats significatifs sur l'analyse histomorphométrique, l'analyse des mécanismes protéiques impliqués que nous avons initiée a été interrompue.

2.3.DISCUSSION

Nous n'avons donc pas réussi à reproduire et exploiter le modèle d'hyperplasie néointimale *ex vivo* statique décrit par Guérin *et al.* [154, 211, 212] avec des prélèvements d'artères mammaires internes. Par conséquent, aucun effet de l'ajout d'hémine, dans le milieu de culture, n'a été mis en évidence. Ces résultats négatifs peuvent s'expliquer par le modèle qui, étant statique, est très éloigné de la réalité *in vivo*, ce qui est souligné par le remodelage concentrique constaté sur les prélèvements mis en culture mais non stentés. Une autre raison peut être le manque de puissance de l'étude, plusieurs prélèvements ayant été exclus en raison de contaminations bactériennes.

En conclusion, ces résultats négatifs viennent conforter notre seconde hypothèse selon laquelle un modèle d'étude *ex vivo* ne peut se concevoir que dans des conditions hémodynamiques de flux systolo-diastolique semblable au vivant, les forces de cisaillements ayant un rôle princeps dans les phénomènes de resténose [119, 120]. Un système permettant le maintien d'un flux intra-artériel correspond beaucoup mieux aux conditions physiologiques. Nous avons donc travaillé à la mise au point d'un bioréacteur permettant d'obtenir un modèle d'hyperplasie intimale *ex vivo*, dans des conditions biologiques et de flux systolo-diastolique semblable au vivant. Ce bioréacteur est un produit biotechnologique inédit, dont la conception et le développement font l'objet de la seconde partie de ce chapitre.

3.ÉLABORATION D'UN BIOREACTEUR, NOUVEAU MODELE D'ETUDE EX VIVO HEMODYNAMIQUE DE RESTENOSE INTRA-STENT

Le développement de ce bioréacteur a fait l'objet du projet BIORIS. Il est le fruit d'une collaboration entre notre équipe de recherche et l'équipe des turbomachines du Laboratoire de Dynamique des Fluides (DynFluid/LEMFI) de l'École Nationale Supérieure d'Arts et Métiers à Paris (ENSAM, 151 boulevard de l'Hôpital, 75013 PARIS). Il fait l'objet d'un dépôt de brevet d'invention [213].

3.1.OBJECTIFS SCIENTIFIQUES DU BIOREACTEUR

Modèle d'étude *ex vivo* de resténose intra-stent. L'objectif scientifique du bioréacteur était en premier lieu de réussir à recréer de l'hyperplasie néointimale et de la resténose intra-stent en conditions *ex vivo* hémodynamiques, en générant dans les prélèvements artériels un flux circulant systolo-diastolique. Une première étape était donc la validation du modèle *ex vivo* hémodynamique de resténose intra stent par comparaison d'un groupe de 3 prélèvements artériels stentés avec un stent inerte et d'un groupe de 3 prélèvements artériels stentés avec un stent actif (sirolimus) dont l'efficacité sur la resténose est démontrée. La validation du modèle s'effectuant par une analyse morphométrique comparative 28 jours après le début de l'expérimentation, qui devrait mettre en évidence une différence entre les deux groupes.

Modèle d'étude *ex vivo* de nouveaux stents actifs et de nouvelles drogues. L'objectif du modèle, après sa validation, était de permettre une étude approfondie des caractéristiques de nouveaux stents actifs de petit calibre : dosages précis et multiples du relargage du polymère et de sa dégradation ; analyse précise de la cinétique de relargage de la drogue et de sa distribution tissulaire ; analyses histologiques à différents temps par prélèvement d'une partie des artères mises en dérivation. Cette analyse devait pouvoir s'effectuer dans différentes conditions hémodynamiques (par modification de la pression artérielle, de la fréquence de rotation et du débit), par exemple pour tester la réaction d'une artère en condition d'insuffisance cardiaque, d'augmentation de la post-charge, ou pour reproduire une circulation d'artères coronaires ou d'artères infra-poplitées. Les expérimentations devaient pouvoir être effectuées sur des tissus artériels humains sains (prélevés comme précédemment décrit lors de prélèvements multi-organes) ou pathologiques (prélèvements sur cœur explantés ou lors d'amputation).

Modèle d'étude de la dynamique des fluides intra-stent. Le bioréacteur devait permettre une analyse de l'écoulement des flux dans les artères et dans le stent par métrologie non-intrusive des écoulements, qui, corrélée à des simulations numériques, devrait aider à une meilleure conception des stents.

3.2.METHODOLOGIE

3.2.1.CAHIER DES CHARGES DU BIOREACTEUR

La pompe pulsatile. Le bioréacteur comprend une pompe qui permet une circulation systolo-diastolique du liquide dans le circuit sur une longue période. Cette pompe répond aux critères suivants :

- être pulsatile, afin de reproduire une circulation systolo-diastolique dont la pression artérielle (PA) est physiologique (110 à 140 mmHg pour la PA systolique ; 60 à 80 mmHg pour la PA diastolique ; 70 à 95 mmHg pour la PA moyenne ; 60 à 80 battements par minutes) mais doit être modulable.
- donner un débit circulant ajustable pour permettre de mimer différentes localisations artérielles (300 ml/min en moyenne pour les artères coronaires et 50 ml/min pour les artères infra-poplitées)
- permettre d'éviter les zones stagnantes pour le fluide circulant
- être biocompatible
- pouvoir fonctionner en milieu humide et à 37°C saturé à 5% de CO₂ (incubateur)
- dégager peu de chaleur
- avoir une taille réduite.

Pour répondre à ces critères, nous avons utilisé une pompe centrifuge qui est simple d'utilisation, peu coûteuse, et qui permet une maîtrise facile du débit et de la pression. Cette pompe a des applications courantes dans le domaine médical. La pression pulsatile est contrôlée par la variation de la vitesse de rotation de la pompe, commandée par une carte de commande et d'acquisition NI USB-6008 et une interface Labview (Fig. 35).

L'acquisition des données. Le circuit est relié à l'alimentation générale, ainsi qu'à un ordinateur porteur du logiciel de traitement des données Labview et d'une carte d'acquisition des données afin de traiter et d'enregistrer l'ensemble des paramètres hémodynamiques sur toute la durée de l'expérimentation (28 jours).

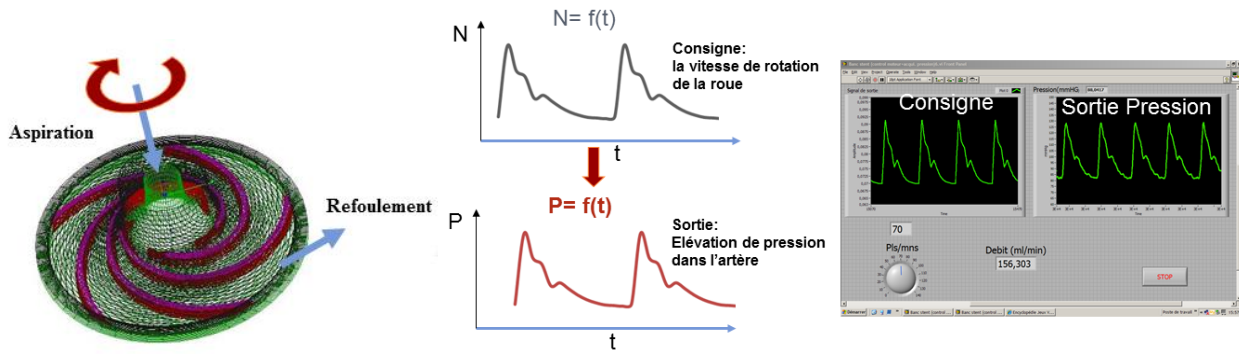


Fig. 35 : Schéma et fonctionnement de la pompe centrifuge et interface de commande labview permettant l'ajustement des consignes de pression et fréquence, et l'enregistrement des données. Les pulsations de flux sont modulées par la vitesse de rotation de la roue. P=pression ; N=nombre de tour minute ; f=fréquence ; t=temps.

Le circuit. Le circuit comprend : un capteur de pression (type MEDEXINC, utilisé pour la prise de pression artérielle sanglante dans le domaine médicale) ; un débitmètre (Digma CH-2563 Ipsach) ; deux vannes permettant un ajustement des valeurs de débit et de pression ; un bac de réservoir de liquide circulant permettant les variations de débit ; un robinet servant à la vidange, au remplissage, aux prélèvements de liquide circulant de façon stérile ; des tuyaux en silicone et de diamètre 10mm ; un bac de culture (cf). L'ensemble des matériaux sont biocompatibles et stériles ou stérilisables par autoclave. Le principe du circuit est illustré par la figure 36.

Le bac de culture tissulaire. Il permet de contenir 6 artères branchées en dérivation de façon étanche sur le circuit. Les connections (embouts) entre la tubulure et l'artère sont réalisées avec des aiguilles (aiguille Luer Lock, diamètre interne 2,1mm, diamètre externe 2,4mm, Vygon France, Ecouen, France) sectionnées pour avoir une longueur de 15 mm, et crantées pour permettre l'étanchéité. Le bac est suffisamment profond pour permettre l'immersion totale des prélèvements dans du milieu de culture. Il est fixé à un support amovible et détachable simplement et stérilement du circuit principal grâce à des connections rapides sans goutte, afin de permettre le changement de milieu de culture toutes les 48 heures stérilement sous hotte à flux laminaire. Enfin, le couvercle du bac doit protéger les prélèvements de la contamination bactérienne sans empêcher l'oxygénation tissulaire, et être muni d'un système anti-débordement en cas de fuite. L'ensemble est stérilisable.

Le liquide circulant. Le liquide circulant doit correspondre à la viscosité sanguine afin de reproduire des forces de cisaillement semblables dans les vaisseaux, être nutritif pour les couches internes de la paroi vasculaire et non toxique. Suivant les travaux publiés dans la littérature, nous avons donc utilisé un mélange de milieu de culture cellulaire (60%) et de glycérol (40%) [214].

L'incubateur. L'ensemble des éléments du circuit, en dehors du câble d'alimentation électrique et de la connexion à l'ordinateur sont placés dans un incubateur à 37°C, en milieu humide et sous 5% de CO₂ afin de maintenir la viabilité des prélèvements artériels durant toute la durée de l'expérimentation.

3.2.2. PLAN DU BIOREACTEUR

Le plan final du bioréacteur intègre l'ensemble des impératifs techniques liés au cahier des charges précédemment décrit. Il est conçu sur trois étages afin de loger dans un incubateur de culture cellulaire (Fig 36).

3.2.1. VALIDATION DU MODELE *EX VIVO* DE RESTENOSE INTRA STENT

Validation du flux systolo-diastolique. Un prototype du bioréacteur était construit au préalable afin de démontrer la faisabilité de pouvoir reproduire : 1) un flux systolo-diastolique dans ce type de circuit grâce à la mini-pompe centrifuge ; 2) une pression artérielle physiologique et 3) un débit circulant ajustable. Les contraintes liées au vivant n'y étaient pas prises en compte.

Validation du fonctionnement du bioréacteur. Suivant les plans décrits, un premier bioréacteur était construit et après divers ajustements, était testé en dehors des conditions biologiques (artères en plastiques) sur une durée de 8 heures. Le liquide circulant était du milieu de culture cellulaire.

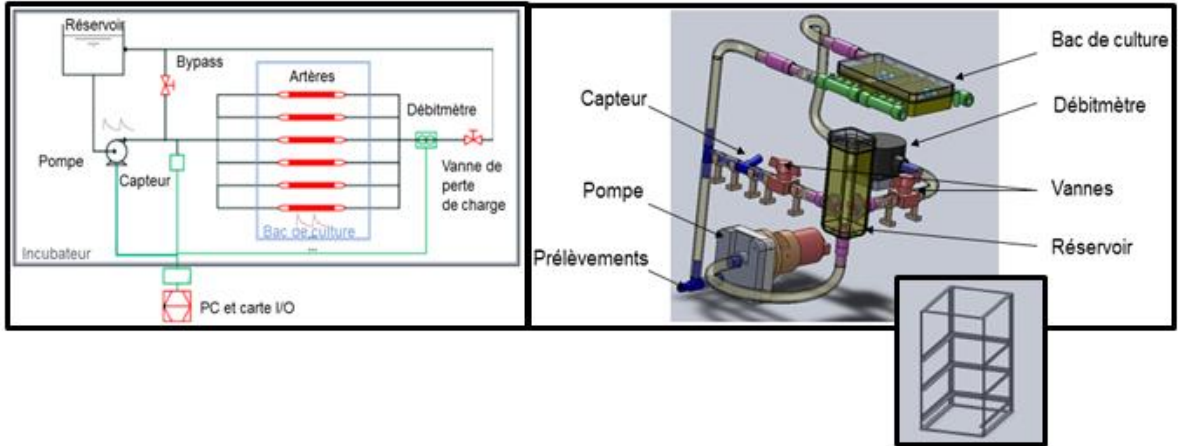


Fig. 36 : plan du bioréacteur 2D ou 3D et plan de l'armoire métallique permettant son logement sur 3 étages dans l'incubateur.

Validation du fonctionnement en conditions physiologiques avec tissus vivants. Après stérilisation de l'ensemble des pièces du bioréacteur (en autoclave à 121°C durant 20 minutes), le circuit était entièrement remonté stérilement sous hotte à flux laminaire. Trois rats mâles Wistar, 400-450g (Elevage Charles Rivers, France) étaient anesthésiés (ketamine 130 mg/kg et xylazine 14 mg/kg par voie intrapéritonéale). Par thoraco-lombotomie, l'aorte thoracique était disséquée et l'ensemble des artères collatérales ligaturées individuellement au fils de Prolène 8/0. Après héparinisation systémique (héparine non fractionnée 100 UI/kg IV) injectée dans la veine cave inférieure, la crosse aortique était clampée ainsi que l'aorte cœliaque, puis l'aorte thoracique délicatement prélevée et plongée dans un pot stérile contenant du sérum physiologique stérile. Les rats étaient ensuite sacrifiés par exsanguination. Les prélèvements artériels étaient alors apportés sous la hotte à flux laminaire contenant le bioréacteur, puis intégré dans le circuit via les embouts. L'étanchéité était assurée par une ligature circulaire au prolène 5/0 dans le crantage de l'embout. Une fois entièrement raccordé, le circuit était amorcé puis un flux systolo-diastolique de faible amplitude y circulait. Le liquide circulant était composé de milieu de culture cellulaire (60%) et de glycérol (40%). L'ensemble était alors placé dans l'incubateur durant 2 heures.

3.3. RESULTATS

3.3.1. PROTOTYPE

Le prototype du bioréacteur a démontré la faisabilité d'obtenir un flux systolo-diastolique dans le circuit et dans chaque artère, individuellement, confirmé par implantation d'un débitmètre en dérivation juste avant l'artère factice (Fig. 37).

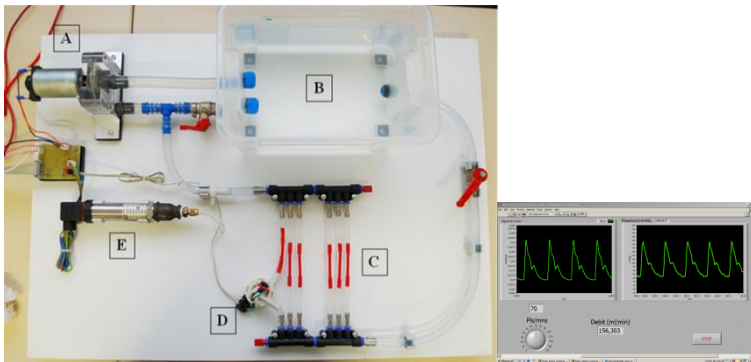
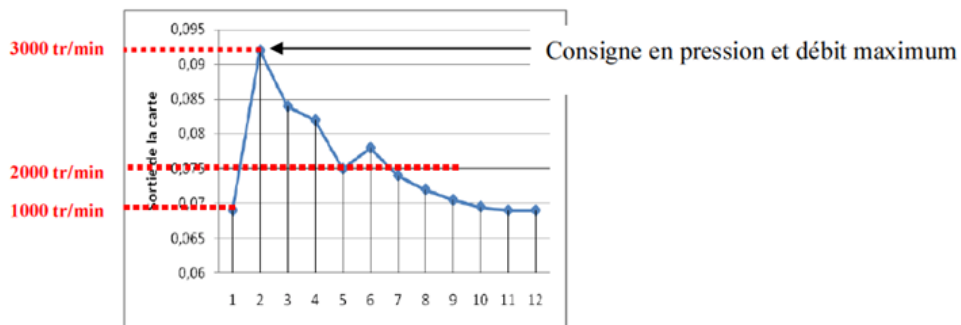


Fig. 37 : Prototype du bioréacteur ayant démontré la faisabilité de reproduire un flux systolo-diastolique.

- A : pompe centrifuge ;
- B : réservoir ;
- C : artères factices ;
- D : débitmètre ;
- E : capteur de pressions.



3.3.2. BIOREACTEUR

Le premier bioréacteur conçu était testé une première fois avec des artères en plastiques et en dehors de l'incubateur afin de tester son étanchéité et sa résistance. Le bioréacteur a ainsi fonctionné une journée de 8 heures sans incident technique et sans fuite (Fig. 38).

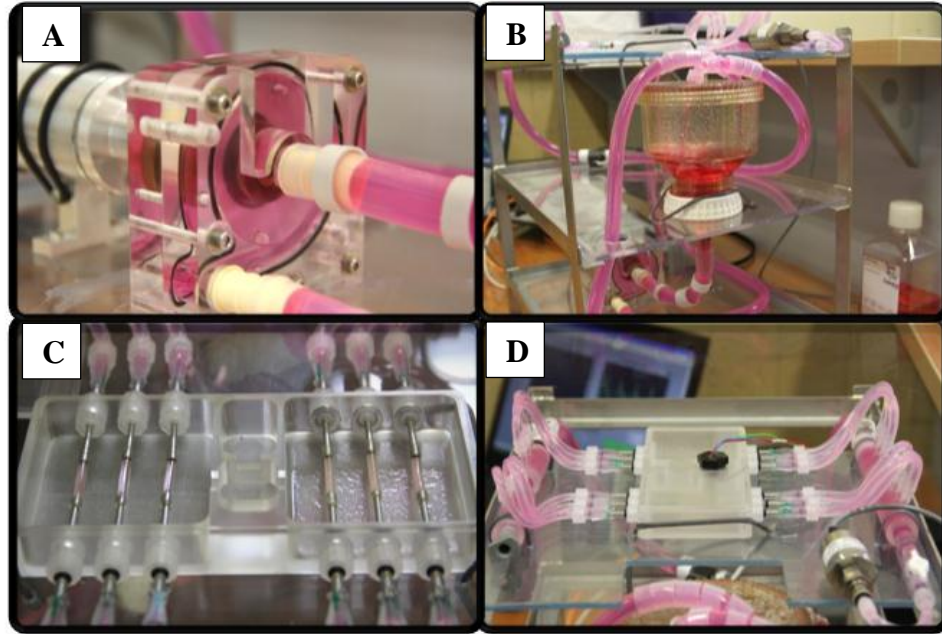


Fig. 38 : Fonctionnement sur 8 heures du bioréacteur avec des artères en plastiques.
A : pompe centrifuge. **B** : bac de réservoir de liquide circulant permettant les variations de débit.
C : Bac de culture tissulaire avec les 6 artères en plastiques branchées en dérivation. **D** : Bac de culture tissulaire et son couvercle avec son système anti débordement qui interrompt la pompe s'il détecte une fuite.

Le bioréacteur a ensuite été testé une première fois en conditions physiologiques avec des prélèvements artériels d'aorte thoracique de rat. Le bioréacteur a pu fonctionner sur 2 heures en étant étanche, avec une pression systolique maximale que nous avons progressivement augmentée jusqu'à 90 - 100mmHg. En revanche, lors de la poursuite de l'augmentation des pressions, une fuite est survenue sur un prélèvement artériel, en regard de la ligature d'une collatérale, nécessitant l'interruption de l'expérimentation (Fig. 39).

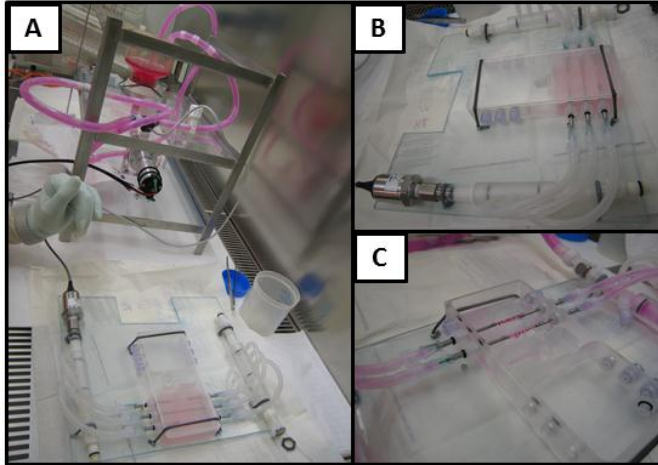


Fig. 39 : Fonctionnement du bioréacteur avec 3 aortes thoraciques de rat branchées en dérivation dans le circuit.

A : Montage sous hotte stérile du bioréacteur

B: Et séparation de la plateforme contenant les le bac de culture pour la mise en place des artères

C: Après 2 heures de fonctionnement et augmentation de la pression, constatation d'une fuite sur un prélèvement.

3.4.DISCUSSION

Dans l'étude de la physiopathologie artérielle et de l'hémodynamique, le modèle animal bien qu'actuellement incontournable, pose des difficultés de prélèvements itératifs. La réalisation de prélèvements histologiques à des temps différents est impossible, tout comme l'étude du liquide péri-artériel, ou l'étude de l'éluion d'une drogue ou d'un polymère. Aucun modèle animal ne permet la reproduction de sténoses athéromateuses semblables à l'homme ou de travailler directement sur du tissu humain. Le développement de notre modèle d'étude *ex vivo* de la resténose devrait permettre de s'affranchir de la plupart de ces difficultés. Ces travaux montrent la faisabilité à court terme du modèle, valorisé par un dépôt de brevet [213], avec la réalisation d'une première approche en conditions physiologiques avec du tissu artériel aortique de rat.

Les bioréacteurs avec flux circulant en boucle sont déjà utilisés par plusieurs équipes de recherche, sous diverses formes et pour répondre à de multiples applications. La plupart étudient les relations quantitatives entre la prolifération cellulaire, la morphologie cellulaire et les conditions d'écoulement appliquées [206-208]. En particulier un bioréacteur permet, grâce à une fine couche cellulaire endothéliale placée dans un cylindre transparent, d'étudier les écoulements avec une pompe produisant un flux pulsé sinusoïdal [210]. Toutefois, à notre connaissance, aucun ne permet une étude de la culture tissulaire au long cours et une réelle étude *ex vivo* de la resténose. Notre bioréacteur est conçu pour permettre l'étude de plusieurs artères stentées en

dérivation (jusqu'à 6), dans lesquelles circule un flux systolo-diastolique physiologique dont le débit et la pression sont ajustables selon le type d'artère étudiée (artères coronaires ou artères infra-poplitées) et aux conditions physiologiques que l'on voudra reproduire (patient normal ou hypertendu...). De plus notre bioréacteur est conçu pour permettre une étude au long cours, avec possibilités de changement du milieu de culture régulièrement tout en limitant au maximum le risque d'infection lors des différentes manipulations.

Nos travaux démontrent la faisabilité du système sur une courte période. Toutefois, nous n'avons pas encore testé notre bioréacteur sur une longue période (28 jours), afin de confirmer son utilisation au long cours avec du matériel vivant, sans fuites, ni pannes, ni infection. Un meilleur ajustement de la pression artérielle et une optimisation des zones d'étanchéité autour de l'artère et des collatérales devrait permettre de limiter les fuites. De plus, nous n'avons pas encore démontré la fonctionnalité du modèle pour l'étude de la resténose. Une fois la faisabilité sur une longue période démontrée, nous comptons valider ce modèle *ex vivo* de resténose en prélevant 6 aortes thoraciques de rat, dont 3 seront stentées avec un stent nu et 3 avec un stent actif au sirolimus. L'analyse histologique à 28 jours de l'implantation du stent et de la mise en culture dynamique permettra de quantifier la différence de formation de néointima entre les deux groupes et de valider, ou d'invalider, le modèle. Nous avons déjà validé notre modèle de resténose chez l'animal par cette même comparaison. Cette validation fera l'objet de prochains travaux.

Nous avons utilisé l'aorte thoracique du rat et non l'aorte abdominale comme le modèle décrit *in vivo*, en raison de difficultés techniques liées au petit diamètre de l'aorte sous rénale, et à une longueur de tissu insuffisante pour permettre une étanchéité de part et d'autre de l'artère ainsi que la mise en place du stent. L'aorte thoracique au contraire, même si elle est décrite comme moins sensible à la resténose est un modèle décrit dans la littérature [150] et possède des dimensions adaptées au bioréacteur.

Le fluide circulant que nous avons utilisé est composé de milieu de culture cellulaire mélangé à du glycérol, permettant de reproduire la viscosité sanguine [214]. Toutefois, si ce modèle permet de reproduire les forces de cisaillement, il ne permet pas d'étudier la réponse plaquettaire et inflammatoire physiologiques après l'implantation du stent. Néanmoins, le but recherché par ce

modèle *ex vivo* n'est pas une étude complète de la resténose, mais un modèle d'étude complémentaire de ce qu'apporte l'expérimentation animale.

3.5.CONCLUSION

Un modèle d'étude *ex vivo* de la resténose en conditions hémodynamiques et biologiques semblables au vivant est un outil inédit qui pourrait permettre de pallier aux limites des modèles animaux. Ce modèle serait particulièrement bien adapté à l'évaluation de nouveaux stents actifs. Ce bioréacteur est actuellement conçu et sa validation en cours. Dans la littérature, seul un modèle *ex vivo* statique est décrit, que nous n'avons pas réussi à reproduire (chapitre 3, section 2.2).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

CONCLUSION GENERALE

Le développement de nouveaux stents actifs constitue une thématique de recherche princeps dans le domaine des biomatériaux cardio-vasculaires. Au cours de ces travaux, nous avons démontré l'intérêt de deux nouvelles molécules dans le développement de ces nouveaux stents.

D'une part l'hémine, qui par l'induction de l'hème oxygénase-1 et la libération de monoxyde de carbone, réduit significativement la resténose intra-stent, tout en permettant une ré-endothélialisation des mailles du stent comparable à celle obtenue avec un stent nu. Toutefois, son mode d'administration systémique chez l'homme est difficile et son administration systémique à forte dose est hépatotoxique. Son utilisation au long cours lors de l'implantation d'un stent ne s'envisage donc que par une administration locale *via* le stent.

D'autre part EP224283, par une action anti GP IIb / IIIa complétée d'une action anti facteur Xa, réduit significativement la resténose intra-stent. De plus, son action anti facteur Xa laisse supposer un effet protecteur contre la thrombose de stent. En ce qui concerne sa fixation sur un stent, EP224283 possède une partie biotine, qui par sa forte affinité à l'avidine, permettrait de fixer l'EP224283 sans l'intermédiaire d'un polymère.

Enfin, compte tenu des diverses limitations des modèles animaux pour l'étude de la resténose et des nouveaux stents actifs, nous avons également développé dans ces travaux un nouveau modèle d'étude *ex vivo* hémodynamique. Celui-ci est particulièrement bien adapté à l'évaluation de nouveaux stents actifs, en complément du modèle animal, en permettant de réaliser de multiples prélèvements tissulaires ou liquidiens, ainsi qu'en offrant la possibilité de travailler avec du tissu artériel humain.

PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Suite à nos résultats très encourageants obtenus *in vivo*, nous poursuivons actuellement nos travaux pour développer une méthode de fixation de l'hémine sur un stent *via* ses fonctions carboxyliques. L'immobilisation de l'hémine pourrait se faire par une liaison peptidique sur la surface métallique du stent contenant des fonctions chimiques réactives ou complémentaires comme les fonctions amines. La dégradation de cette liaison permettrait alors une libération progressive de l'hémine dans la paroi vasculaire. L'hémine étant le substrat et l'inducteur de l'HO-1, une libération progressive est nécessaire à son efficacité. Ce type de fixation a déjà été développé dans notre laboratoire sur des prothèses vasculaires en vasculaires en polyester sur lesquelles des groupes fonctionnels amines ont été apporté par copolymérisation greffante activée par plasma froid. [215].

De même nous travaillons sur la fixation de l'EP224283 sur une surface chrome-cobalt via un système ligand/récepteur (biotine/avidine), la molécule contenant elle même un groupe biotine. Ces travaux, également en cours de réalisation, ont montré qu'une biotine pouvait se fixer de façon covalente sur une surface chrome-cobalt. Sa liaison hautement spécifique avec l'avidine permettra ensuite l'immobilisation de EP224283 via sa biotine sur le stent de façon définitive. Les deux sites actifs de la molécule restant libres, celle-ci devrait conserver son efficacité. Ces données restent à démontrer.

Parallèlement, nous poursuivons nos travaux sur le bioréacteur afin de valider le modèle *ex vivo* hémodynamique d'étude de la resténose. Dans un premier temps nous comptons faire fonctionner le bioréacteur sur une longue période. Puis, nous validerons le modèle par comparaison histomorphométrique entre 3 artères stentées avec un stent nu et 3 artères stentées avec un stent actif au sirolimus ou au paclitaxel.

Selon les résultats de ces prochains travaux, le but final sera d'étudier les effets de nos deux nouveaux stents actifs, avec fixation d'hémine et de EP224283, contre la resténose intra stent et contre la thrombose aiguë de stent. Nous réaliserons cette évaluation d'une part *in vivo* chez le lapin hypercholestérolémique et sur des artères coronaires de porc - modèle faisant actuellement référence - et d'autre part *ex vivo* avec notre bioréacteur sur du tissu artériel humain.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Gregg DE, Khouri EM, Rayford CR. Systemic and Coronary Energetics in the Resting Unanesthetized Dog. *Circulation research*. 1965;16:102-13.
- [2] Reagan TR, Miller CW, Strandness DE, Jr. Transcutaneous measurement of femoral artery flow. *The Journal of surgical research*. 1971;11:477-82.
- [3] Bevegard S, Freyschuss U, Strandell T. Circulatory adaptation to arm and leg exercise in supine and sitting position. *Journal of applied physiology*. 1966;21:37-46.
- [4] Remington JW, Wood EH. Formation of peripheral pulse contour in man. *Journal of applied physiology*. 1956;9:433-42.
- [5] Allaire E, Clowes AW. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *The Annals of thoracic surgery*. 1997;63:582-91.
- [6] Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *The New England journal of medicine*. 1990;323:27-36.
- [7] Flammer AJ, Anderson T, Celermajer DS, Creager MA, Deanfield J, Ganz P, et al. The assessment of endothelial function: from research into clinical practice. *Circulation*. 2012;126:753-67.
- [8] Xu J, Zou MH. Molecular insights and therapeutic targets for diabetic endothelial dysfunction. *Circulation*. 2009;120:1266-86.
- [9] Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research*. 2004;95:343-53.
- [10] van Gils JM, Zwavinga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85:195-204.
- [11] Ribatti D, Nico B, Crivellato E. The role of pericytes in angiogenesis. *The International journal of developmental biology*. 2011;55:261-8.
- [12] Rzuclidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg*. 2007;45 Suppl A:A25-32.
- [13] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circulation research*. 2001;89:1111-21.

Bibliographie

- [14] Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science*. 1973;180:1332-9.
- [15] Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89:2462-78.
- [16] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-74.
- [17] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2000;20:1262-75.
- [18] Fuster V, Fayad ZA, Badimon JJ. Acute coronary syndromes: biology. *Lancet*. 1999;353 Suppl 2:SII5-9.
- [19] Herisson F, Heymann MF, Chetiveaux M, Charrier C, Battaglia S, Pilet P, et al. Carotid and femoral atherosclerotic plaques show different morphology. *Atherosclerosis*. 2011;216:348-54.
- [20] Davies MJ. Glagovian remodelling, plaque composition, and stenosis generation. *Heart*. 2000;84:461-2.
- [21] Laine P, Kaartinen M, Penttila A, Panula P, Paavonen T, Kovanen PT. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. *Circulation*. 1999;99:361-9.
- [22] Brunner H, Cockcroft JR, Deanfield J, Donald A, Ferrannini E, Halcox J, et al. Endothelial function and dysfunction. Part II: Association with cardiovascular risk factors and diseases. A statement by the Working Group on Endothelins and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *Journal of hypertension*. 2005;23:233-46.
- [23] Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiological reviews*. 2006;86:515-81.
- [24] Jessup W, Wilson P, Gaus K, Kritharides L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascular pharmacology*. 2002;38:239-48.
- [25] Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free radical biology & medicine*. 1996;20:707-27.
- [26] Westhuyzen J. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update. *Annals of clinical and laboratory science*. 1997;27:1-10.

Bibliographie

- [27] Tabas I. Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis. *Annual review of nutrition*. 1999;19:123-39.
- [28] Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2011;31:969-79.
- [29] Tabas I. Cholesterol and phospholipid metabolism in macrophages. *Biochimica et biophysica acta*. 2000;1529:164-74.
- [30] Bottalico LA, Kendrick NC, Keller A, Li Y, Tabas I. Cholesteryl ester loading of mouse peritoneal macrophages is associated with changes in the expression or modification of specific cellular proteins, including increase in an alpha-enolase isoform. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1993;13:264-75.
- [31] Larkin L, Khachigian LM, Jessup W. Regulation of apolipoprotein E production in macrophages (review). *International journal of molecular medicine*. 2000;6:253-8.
- [32] Hulten LM, Lindmark H, Diczfalusy U, Bjorkhem I, Ottosson M, Liu Y, et al. Oxysterols present in atherosclerotic tissue decrease the expression of lipoprotein lipase messenger RNA in human monocyte-derived macrophages. *The Journal of clinical investigation*. 1996;97:461-8.
- [33] Johnson RC, Leopold JA, Loscalzo J. Vascular calcification: pathobiological mechanisms and clinical implications. *Circulation research*. 2006;99:1044-59.
- [34] Cimmino G, Golino P, Badimon JJ. Pathophysiological role of blood-borne tissue factor: should the old paradigm be revisited? *Internal and emergency medicine*. 2011;6:29-34.
- [35] Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Finn AV, Gold HK, Tulenko TN, et al. Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:2054-61.
- [36] Boyle EM, Jr., Lille ST, Allaire E, Clowes AW, Verrier ED. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: atherosclerosis. *The Annals of thoracic surgery*. 1997;63:885-94.
- [37] Samady H, Eshtehardi P, McDaniel MC, Suo J, Dhawan SS, Maynard C, et al. Coronary artery wall shear stress is associated with progression and transformation of atherosclerotic plaque and arterial remodeling in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2011;124:779-88.
- [38] Zimmerman M, McGeachie JK. The effects of nicotine on aortic endothelial cell turnover and ultrastructure. *Advances in experimental medicine and biology*. 1990;273:79-88.
- [39] Lin SJ, Hong CY, Chang MS, Chiang BN, Chien S. Long-term nicotine exposure increases aortic endothelial cell death and enhances transendothelial macromolecular transport in rats. *Arteriosclerosis and thrombosis : a journal of vascular biology / American Heart Association*. 1992;12:1305-12.

Bibliographie

[40] Luscher TF. The endothelium and cardiovascular disease--a complex relation. *The New England journal of medicine*. 1994;330:1081-3.

[41] Takasaki I, Chobanian AV, Brecher P. Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *The Journal of biological chemistry*. 1991;266:17686-94.

[42] Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension*. 1992;20:253-63.

[43] Holdt LM, Teupser D. Recent studies of the human chromosome 9p21 locus, which is associated with atherosclerosis in human populations. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2012;32:196-206.

[44] Shea TM, Watson RM, Piotrowski SF, Dermksian G, Case RB. Anaerobic myocardial metabolism. *The American journal of physiology*. 1962;203:463-9.

[45] Carrel A. VIII. On the Experimental Surgery of the Thoracic Aorta and Heart. *Annals of surgery*. 1910;52:83-95.

[46] DeBakey ME, Crawford ES, Fields WS. Surgical treatment of patients with cerebral arterial insufficiency associated with extracranial arterial occlusive lesions. *Neurology*. 1961;11(4)Pt 2:145-9.

[47] Garrett HE, Dennis EW, DeBakey ME. Aortocoronary bypass with saphenous vein graft. Seven-year follow-up. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1973;223:792-4.

[48] Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine*. 1994;331:496-501.

[49] Cragg A, Lund G, Rysavy J, Castaneda F, Castaneda-Zuniga W, Amplatz K. Nonsurgical placement of arterial endoprostheses: a new technique using nitinol wire. *Radiology*. 1983;147:261-3.

[50] Dotter CT. Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery. *Investigative radiology*. 1969;4:329-32.

[51] Palmaz JC, Sibbitt RR, Tio FO, Reuter SR, Peters JE, Garcia F. Expandable intraluminal vascular graft: a feasibility study. *Surgery*. 1986;99:199-205.

[52] Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England journal of medicine*. 1987;316:701-6.

[53] Organization WH.

[54] Comission E. Cardiovascular disease. Public Health. http://ec.europa.eu/health/major_chronic_diseases/diseases/cardiovascular/index_en.htm2012.

Bibliographie

- [55] Cardiologie FFd. Votre coeur. <http://www.fedecardio.com/maladies2008>.
- [56] Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001;104:1188-93.
- [57] Eurasanté. Le marché Français des implants. *Bio Santé Info*. 2007;6.
- [58] (CEPS) CEEdPdS. Rapport d'activité du CEPS pour 2011. www.sante.gouv.fr Juillet 2012. p. 30-1.
- [59] Hara H, Nakamura M, Palmaz JC, Schwartz RS. Role of stent design and coatings on restenosis and thrombosis. *Advanced drug delivery reviews*. 2006;58:377-86.
- [60] Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *Journal of the American College of Cardiology*. 2010;56:S43-78.
- [61] Wataha JC, Lockwood PE, Marek M, Ghazi M. Ability of Ni-containing biomedical alloys to activate monocytes and endothelial cells in vitro. *Journal of biomedical materials research*. 1999;45:251-7.
- [62] O'Brien B, Carroll W. The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: a review. *Acta biomaterialia*. 2009;5:945-58.
- [63] Vorpahl M LE, Nakazawa G, Virmani R. Overview of arterial pathology after implantation of a biomaterial. In: Durand NCB, editor. *New technologies in vascular biomaterials Connecting biomaterials to arterial structures: EUROPROT Strasbourg, France; 2009*. p. 1-22.
- [64] Kimura T, Abe K, Shizuta S, Odashiro K, Yoshida Y, Sakai K, et al. Long-term clinical and angiographic follow-up after coronary stent placement in native coronary arteries. *Circulation*. 2002;105:2986-91.
- [65] Farb A, Weber DK, Kolodgie FD, Burke AP, Virmani R. Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation*. 2002;105:2974-80.
- [66] Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *The New England journal of medicine*. 2003;349:1315-23.
- [67] Lejay A, Georg Y, Bajcz C, Thaveau F, Geny B, Kretz JG, et al. Endovascular treatment of infra-popliteal arteries in patients with critical limb ischemia. *Acta chirurgica Belgica*. 2009;109:684-93.
- [68] Dube H, Clifford AG, Barry CM, Schwarten DE, Schwartz LB. Comparison of the vascular responses to balloon-expandable stenting in the coronary and peripheral circulations: long-term results in an animal model using the TriMaxx stent. *J Vasc Surg*. 2007;45:821-7.

Bibliographie

- [69] Goldberg SL, Loussararian A, De Gregorio J, Di Mario C, Albiero R, Colombo A. Predictors of diffuse and aggressive intra-stent restenosis. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37:1019-25.
- [70] Hsieh IC, Chien CC, Chang HJ, Chern MS, Hung KC, Lin FC, et al. Acute and long-term outcomes of stenting in coronary vessel > 3.0 mm, 3.0-2.5 mm, and < 2.5 mm. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2001;53:314-22.
- [71] Kastrati A, Elezi S, Dirschinger J, Hadamitzky M, Neumann FJ, Schomig A. Influence of lesion length on restenosis after coronary stent placement. *The American journal of cardiology*. 1999;83:1617-22.
- [72] de Feyter PJ, Kay P, Disco C, Serruys PW. Reference chart derived from post-stent-implantation intravascular ultrasound predictors of 6-month expected restenosis on quantitative coronary angiography. *Circulation*. 1999;100:1777-83.
- [73] Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Bucher TA, et al. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation*. 1997;95:1366-9.
- [74] Woudstra P, Damman P, Beijk MA, Grundeken MJ, Harskamp RE, Koch KT, et al. Clinical outcomes after bare metal stenting in diabetic patients with lesions carrying a low risk of restenosis. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2012.
- [75] Bennett MR, O'Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2001;91:149-66.
- [76] Indolfi C, Esposito G, Di Lorenzo E, Rapacciuolo A, Felicciello A, Porcellini A, et al. Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty. *Circulation*. 1995;92:1230-5.
- [77] Indolfi C, Torella D, Coppola C, Stabile E, Esposito G, Curcio A, et al. Rat carotid artery dilation by PTCA balloon catheter induces neointima formation in presence of IEL rupture. *American journal of physiology*. 2002;283:H760-7.
- [78] Srinivasan R, Marchant RE, Gupta AS. In vitro and in vivo platelet targeting by cyclic RGD-modified liposomes. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;93:1004-15.
- [79] Schober A, Manka D, von Hundelshausen P, Huo Y, Hanrath P, Sarembock IJ, et al. Deposition of platelet RANTES triggering monocyte recruitment requires P-selectin and is involved in neointima formation after arterial injury. *Circulation*. 2002;106:1523-9.
- [80] Gaspardone A, Versaci F. Coronary stenting and inflammation. *The American journal of cardiology*. 2005;96:65L-70L.

Bibliographie

[81] Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, et al. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl A:A15-24.

[82] Liang KW, Yin SC, Ting CT, Lin SJ, Hsueh CM, Chen CY, et al. Berberine inhibits platelet-derived growth factor-induced growth and migration partly through an AMPK-dependent pathway in vascular smooth muscle cells. *European journal of pharmacology.* 2008;590:343-54.

[83] Zalewski A, Shi Y, Johnson AG. Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circulation research.* 2002;91:652-5.

[84] Yoshida T, Owens GK. Molecular determinants of vascular smooth muscle cell diversity. *Circulation research.* 2005;96:280-91.

[85] Ferguson JE, 3rd, Patterson C. Break the cycle: the role of cell-cycle modulation in the prevention of vasculoproliferative diseases. *Cell cycle.* 2003;2:211-9.

[86] Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S. Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *The Journal of cell biology.* 2000;148:543-56.

[87] Kintscher U, Wakino S, Kim S, Jackson SM, Fleck E, Hsueh WA, et al. Doxazosin inhibits retinoblastoma protein phosphorylation and G(1)-->S transition in human coronary smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2000;20:1216-24.

[88] Smith RC, Wills KN, Antelman D, Perlman H, Truong LN, Krasinski K, et al. Adenoviral constructs encoding phosphorylation-competent full-length and truncated forms of the human retinoblastoma protein inhibit myocyte proliferation and neointima formation. *Circulation.* 1997;96:1899-905.

[89] Marra DE, Simoncini T, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21(Waf1) and p27(Kip1). *Circulation.* 2000;102:2124-30.

[90] Perez J, Torres RA, Rocic P, Cismowski MJ, Weber DS, Darley-Usmar VM, et al. PYK2 signaling is required for PDGF-dependent vascular smooth muscle cell proliferation. *American journal of physiology Cell physiology.* 2011;301:C242-51.

[91] Liang J, Slingerland JM. Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell cycle.* 2003;2:339-45.

[92] Meloche S, Pouyssegur J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene.* 2007;26:3227-39.

[93] Sakakibara K, Kubota K, Worku B, Ryer EJ, Miller JP, Koff A, et al. PDGF-BB regulates p27 expression through ERK-dependent RNA turn-over in vascular smooth muscle cells. *The Journal of biological chemistry.* 2005;280:25470-7.

Bibliographie

- [94] Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin. *Circulation research*. 2004;95:579-86.
- [95] Nomiyama T, Nakamachi T, Gizard F, Heywood EB, Jones KL, Ohkura N, et al. The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281:33467-76.
- [96] Miura S, Matsuo Y, Kawamura A, Saku K. JTT-705 blocks cell proliferation and angiogenesis through p38 kinase/p27(kip1) and Ras/p21(waf1) pathways. *Atherosclerosis*. 2005;182:267-75.
- [97] Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995;270:1326-31.
- [98] Li XA, Bianchi C, Sellke FW. Rat aortic smooth muscle cell density affects activation of MAP kinase and Akt by menadione and PDGF homodimer BB. *The Journal of surgical research*. 2001;100:197-204.
- [99] Bornfeldt KE, Raines EW, Nakano T, Graves LM, Krebs EG, Ross R. Insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor-BB induce directed migration of human arterial smooth muscle cells via signaling pathways that are distinct from those of proliferation. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93:1266-74.
- [100] Ishikura K, Fujita H, Hida M, Awazu M. Trapidil inhibits platelet-derived growth factor-induced migration via protein kinase A and RhoA/Rho-associated kinase in rat vascular smooth muscle cells. *European journal of pharmacology*. 2005;515:28-33.
- [101] San Martin A, Lee MY, Williams HC, Mizuno K, Lassegue B, Griendling KK. Dual regulation of cofilin activity by LIM kinase and Slingshot-1L phosphatase controls platelet-derived growth factor-induced migration of human aortic smooth muscle cells. *Circulation research*. 2008;102:432-8.
- [102] Stankovic G, Colombo A, Presbitero P, van den Branden F, Inglese L, Cernigliaro C, et al. Randomized evaluation of polytetrafluoroethylene-covered stent in saphenous vein grafts: the Randomized Evaluation of polytetrafluoroethylene COVERed stent in Saphenous vein grafts (RECOVERS) Trial. *Circulation*. 2003;108:37-42.
- [103] Kwok OH, Ng W, Chow WH. Late stent thrombosis after successful rescue of a major coronary artery rupture with a polytetrafluoroethylene-covered stent. *The Journal of invasive cardiology*. 2001;13:391-4.
- [104] de Feyter PJ, Vos J, Rensing BJ. Anti-restenosis Trials. *Current interventional cardiology reports*. 2000;2:326-31.
- [105] Venkatraman S, Boey F. Release profiles in drug-eluting stents: issues and uncertainties. *J Control Release*. 2007;120:149-60.

Bibliographie

- [106] Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *The New England journal of medicine*. 2004;350:221-31.
- [107] Sousa JE, Costa MA, Sousa AG, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, et al. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation*. 2003;107:381-3.
- [108] Tsuchida K, Piek JJ, Neumann FJ, van der Giessen WJ, Wiemer M, Zeiher AM, et al. One-year results of a durable polymer everolimus-eluting stent in de novo coronary narrowings (The SPIRIT FIRST Trial). *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2005;1:266-72.
- [109] Fajadet J, Wijns W, Laarman GJ, Kuck KH, Ormiston J, Munzel T, et al. Randomized, double-blind, multicenter study of the Endeavor zotarolimus-eluting phosphorylcholine-encapsulated stent for treatment of native coronary artery lesions: clinical and angiographic results of the ENDEAVOR II trial. *Circulation*. 2006;114:798-806.
- [110] Joner M, Nakazawa G, Finn AV, Quee SC, Coleman L, Acampado E, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52:333-42.
- [111] Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, et al. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *The New England journal of medicine*. 2007;356:1030-9.
- [112] Farb A, Heller PF, Shroff S, Cheng L, Kolodgie FD, Carter AJ, et al. Pathological analysis of local delivery of paclitaxel via a polymer-coated stent. *Circulation*. 2001;104:473-9.
- [113] Kolodgie FD, John M, Khurana C, Farb A, Wilson PS, Acampado E, et al. Sustained reduction of in-stent neointimal growth with the use of a novel systemic nanoparticle paclitaxel. *Circulation*. 2002;106:1195-8.
- [114] van Beusekom HM, Sorop O, van den Heuvel M, Onuma Y, Duncker DJ, Danser AH, et al. Endothelial function rather than endothelial restoration is altered in paclitaxel- as compared to bare metal-, sirolimus and tacrolimus-eluting stents. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2010;6:117-25.
- [115] Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, Guerrero LJ, Acampado E, Tefera K, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation*. 2005;112:270-8.
- [116] Joner M, Finn AV, Farb A, Mont EK, Kolodgie FD, Ladich E, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;48:193-202.

Bibliographie

- [117] Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*. 2011;75:1287-96.
- [118] Plass CA, Sabdyusheva-Litschauer I, Bernhart A, Samaha E, Petnehazy O, Szentirmai E, et al. Time course of endothelium-dependent and -independent coronary vasomotor response to coronary balloons and stents. Comparison of plain and drug-eluting balloons and stents. *JACC Cardiovascular interventions*. 2012;5:741-51.
- [119] Cook S, Wenaweser P, Togni M, Billinger M, Morger C, Seiler C, et al. Incomplete stent apposition and very late stent thrombosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation*. 2007;115:2426-34.
- [120] Ge L, Airoidi F, Iakovou I, Cosgrave J, Michev I, Sangiorgi GM, et al. Clinical and angiographic outcome after implantation of drug-eluting stents in bifurcation lesions with the crush stent technique: importance of final kissing balloon post-dilation. *Journal of the American College of Cardiology*. 2005;46:613-20.
- [121] Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation*. 2003;108:1701-6.
- [122] Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF, Shaw LK, Tuttle RH, Mark DB, et al. Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2007;297:159-68.
- [123] Finn AV, Nakazawa G, Joner M, Kolodgie FD, Mont EK, Gold HK, et al. Vascular responses to drug eluting stents: importance of delayed healing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2007;27:1500-10.
- [124] Virmani R, Guagliumi G, Farb A, Musumeci G, Grieco N, Motta T, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation*. 2004;109:701-5.
- [125] Otsuka Y, Chronos NA, Apkarian RP, Robinson KA. Scanning electron microscopic analysis of defects in polymer coatings of three commercially available stents: comparison of BiodivYsio, Taxus and Cypher stents. *The Journal of invasive cardiology*. 2007;19:71-6.
- [126] De Luca G, Dirksen MT, Spaulding C, Kelbaek H, Schlij M, Thuesen L, et al. Drug-eluting vs bare-metal stents in primary angioplasty: a pooled patient-level meta-analysis of randomized trials. *Archives of internal medicine*. 2012;172:611-21; discussion 21-2.
- [127] Bangalore S, Kumar S, Fusaro M, Amoroso N, Attubato MJ, Feit F, et al. Short- and long-term outcomes with drug-eluting and bare-metal coronary stents: a mixed-treatment comparison analysis of 117 762 patient-years of follow-up from randomized trials. *Circulation*. 2012;125:2873-91.

Bibliographie

- [128] Bosiers M, Scheinert D, Peeters P, Torsello G, Zeller T, Deloose K, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting versus bare-metal stents in patients with critical limb ischemia and infrapopliteal arterial occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2012;55:390-8.
- [129] Rastan A, Noory E, Zeller T. Drug-eluting stents for treatment of focal infrapopliteal lesions. *VASA Zeitschrift für Gefasskrankheiten Journal for vascular diseases.* 2012;41:90-5.
- [130] Ho PM, Peterson ED, Wang L, Magid DJ, Fihn SD, Larsen GC, et al. Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome. *JAMA : the journal of the American Medical Association.* 2008;299:532-9.
- [131] Lemesle G, Paparoni F, Delhaye C, Bonello L, Lablanche JM. Duration of dual antiplatelet therapy after percutaneous coronary intervention with drug-eluting stent implantation: a review of the current guidelines and literature. *Hospital practice.* 2011;39:32-40.
- [132] Xia Y, Prawirasatya M, Heng BC, Boey F, Venkatraman SS. Seeding density matters: extensive intercellular contact masks the surface dependence of endothelial cell-biomaterial interactions. *Journal of materials science Materials in medicine.* 2011;22:389-96.
- [133] Tang C, Wang G, Wu X, Li Z, Shen Y, Lee JC, et al. The impact of vascular endothelial growth factor-transfected human endothelial cells on endothelialization and restenosis of stainless steel stents. *J Vasc Surg.* 2011;53:461-71.
- [134] Allen J, Khan S, Serrano MC, Ameer G. Characterization of porcine circulating progenitor cells: toward a functional endothelium. *Tissue engineering Part A.* 2008;14:183-94.
- [135] Wu X, Wang G, Tang C, Zhang D, Li Z, Du D, et al. Mesenchymal stem cell seeding promotes reendothelialization of the endovascular stent. *Journal of biomedical materials research Part A.* 2011;98:442-9.
- [136] Nourse MB, Halpin DE, Scatena M, Mortisen DJ, Tulloch NL, Hauch KD, et al. VEGF induces differentiation of functional endothelium from human embryonic stem cells: implications for tissue engineering. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2010;30:80-9.
- [137] Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation.* 2008;118:498-506.
- [138] Caifeng Luo YZ, Ziji Diao, Juhui Qiu, Guixue Wang. Review: Research Progress and Future Prospects for Promoting Endothelialization on Endovascular Stents and Preventing Restenosis. *Journal of Medical and Biological Engineering* 2011;31:307-16.
- [139] Beijk MA, Klomp M, Verouden NJ, van Geloven N, Koch KT, Henriques JP, et al. Genous endothelial progenitor cell capturing stent vs. the Taxus Liberte stent in patients with de novo coronary lesions with a high-risk of coronary restenosis: a randomized, single-centre, pilot study. *European heart journal.* 2010;31:1055-64.

Bibliographie

- [140] Tamburino C, Capodanno D, Di Salvo ME, Sanfilippo A, Cascone I, Incardona V, et al. Safety and effectiveness of the Catania Polyzene-F coated stent in real world clinical practice: 12-month results from the ATLANTA 2 registry. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology*. 2012;7:1062-8.
- [141] Windecker S, Simon R, Lins M, Klauss V, Eberli FR, Roffi M, et al. Randomized comparison of a titanium-nitride-oxide-coated stent with a stainless steel stent for coronary revascularization: the TiNOX trial. *Circulation*. 2005;111:2617-22.
- [142] Hardhammar PA, van Beusekom HM, Emanuelsson HU, Hofma SH, Albertsson PA, Verdouw PD, et al. Reduction in thrombotic events with heparin-coated Palmaz-Schatz stents in normal porcine coronary arteries. *Circulation*. 1996;93:423-30.
- [143] De Scheerder I, Wang K, Wilczek K, Meuleman D, Van Amsterdam R, Vogel G, et al. Experimental study of thrombogenicity and foreign body reaction induced by heparin-coated coronary stents. *Circulation*. 1997;95:1549-53.
- [144] Matsumoto Y, Shimokawa H, Morishige K, Eto Y, Takeshita A. Reduction in neointimal formation with a stent coated with multiple layers of releasable heparin in porcine coronary arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2002;39:513-22.
- [145] Lee YK, Hyung Park J, Tae Moon H, Yun Lee D, Han Yun J, Byun Y. The short-term effects on restenosis and thrombosis of echinomycin-eluting stents topcoated with a hydrophobic heparin-containing polymer. *Biomaterials*. 2007;28:1523-30.
- [146] Mehran R, Aymong ED, Ashby DT, Fischell T, Whitworth H, Jr., Siegel R, et al. Safety of an aspirin-alone regimen after intracoronary stenting with a heparin-coated stent: final results of the HOPE (HEPACOAT and an Antithrombotic Regimen of Aspirin Alone) study. *Circulation*. 2003;108:1078-83.
- [147] Haude M, Konorza TF, Kalnins U, Erglis A, Saunamaki K, Glogar HD, et al. Heparin-coated stent placement for the treatment of stenoses in small coronary arteries of symptomatic patients. *Circulation*. 2003;107:1265-70.
- [148] Hong YJ, Jeong MH, Kim W, Lim SY, Lee SH, Hong SN, et al. Effect of abciximab-coated stent on in-stent intimal hyperplasia in human coronary arteries. *The American journal of cardiology*. 2004;94:1050-4.
- [149] Kim W, Jeong MH, Kim KH, Sohn IS, Hong YJ, Park HW, et al. The clinical results of a platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker (abciximab: ReoPro)-coated stent in acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:933-8.
- [150] Lowe HC, James B, Khachigian LM. A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting. *Heart*. 2005;91:393-5.
- [151] Perkins LE. Preclinical models of restenosis and their application in the evaluation of drug-eluting stent systems. *Veterinary pathology*. 2010;47:58-76.

Bibliographie

[152] Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *Journal of the American College of Cardiology*. 2004;44:1373-85.

[153] Virmani R, Kolodgie FD, Farb A, Lafont A. Drug eluting stents: are human and animal studies comparable? *Heart*. 2003;89:133-8.

[154] Guerin P, Rondeau F, Grimandi G, Heymann MF, Heymann D, Pillet P, et al. Neointimal hyperplasia after stenting in a human mammary artery organ culture. *Journal of vascular research*. 2004;41:46-53.

[155] Hua X, Deuse T, Michelakis ED, Haromy A, Tsao PS, Maegdefessel L, et al. Human internal mammary artery (IMA) transplantation and stenting: a human model to study the development of in-stent restenosis. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2012:e3663.

[156] WANG G-x. Drug release determination device of drug-eluting intravascular stent. Republic of China2009.

[157] ZHAO W-hZ, Jun ; YUN, Xia ; LU Bing-heng. Intravascular stent structure design oriented blood flow characteristic test device. China2009.

[158] Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological reviews*. 2006;86:583-650.

[159] Idriss NK, Blann AD, Lip GY. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2008;52:971-8.

[160] Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nature medicine*. 2000;6:422-8.

[161] Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, Liu F, Song R, Usheva A, et al. Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury. *Nature medicine*. 2003;9:183-90.

[162] Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AM, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *The Journal of experimental medicine*. 2000;192:1015-26.

[163] Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*. 2005;112:1030-9.

[164] Balla J, Vercellotti GM, Jeney V, Yachie A, Varga Z, Jacob HS, et al. Heme, heme oxygenase, and ferritin: how the vascular endothelium survives (and dies) in an iron-rich environment. *Antioxidants & redox signaling*. 2007;9:2119-37.

Bibliographie

- [165] Tulis DA, Durante W, Liu X, Evans AJ, Peyton KJ, Schafer AI. Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. *Circulation*. 2001;104:2710-5.
- [166] Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204:605-18.
- [167] Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94:10919-24.
- [168] Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, et al. Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *The Journal of clinical investigation*. 1999;103:129-35.
- [169] Chen YH, Chau LY, Lin MW, Chen LC, Yo MH, Chen JW, et al. Heme oxygenase-1 gene promoter microsatellite polymorphism is associated with angiographic restenosis after coronary stenting. *European heart journal*. 2004;25:39-47.
- [170] Gulesserian T, Wenzel C, Endler G, Sunder-Plassmann R, Marsik C, Mannhalter C, et al. Clinical restenosis after coronary stent implantation is associated with the heme oxygenase-1 gene promoter polymorphism and the heme oxygenase-1 +99G/C variant. *Clinical chemistry*. 2005;51:1661-5.
- [171] Mustafa S, Weltermann A, Fritsche R, Marsik C, Wagner O, Kyrle PA, et al. Genetic variation in heme oxygenase 1 (HMOX1) and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Vasc Surg*. 2008;47:566-70.
- [172] Desbuards N, Rochefort GY, Schlecht D, Machet MC, Halimi JM, Eder V, et al. Heme oxygenase-1 inducer hemin prevents vascular thrombosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2007;98:614-20.
- [173] Desbuards N, Hyvelin JM, Machet MC, Eder V, Garrigue MA, Halimi JM, et al. Heme oxygenase-1 inducer hemin attenuates the progression of remnant kidney model. *Nephron Experimental nephrology*. 2009;113:e35-44.
- [174] Awede B, Lemaire MC, Hyvelin JM, Halimi JM, Bonnet P, Eder V. Hemin, a carbon monoxide donor, improves systemic vascular compliance by inhibiting the RhoA-Rhokinase pathway in spontaneous hypertensive rats. *European journal of pharmacology*. 2010;626:256-61.
- [175] Chen YS, Zhu XX, Zhao XY, Xing HY, Li YG. Hemin, a heme oxygenase-1 inducer, improves aortic endothelial dysfunction in insulin resistant rats. *Chinese medical journal*. 2008;121:241-7.
- [176] Chang T, Wu L, Wang R. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by chronic hemin treatment. *American journal of physiology*. 2008;295:H999-H1007.

Bibliographie

- [177] Hualin C, Wenli X, Dapeng L, Xijing L, Xiuhua P, Qingfeng P. The anti-inflammatory mechanism of heme oxygenase-1 induced by hemin in primary rat alveolar macrophages. *Inflammation*. 2012;35:1087-93.
- [178] Hechler B, Freund M, Alame G, Leguay C, Gaertner S, Cazenave JP, et al. The antithrombotic activity of EP224283, a neutralizable dual factor Xa inhibitor/glycoprotein IIb/IIIa antagonist, exceeds that of the coadministered parent compounds. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;338:412-20.
- [179] Lynch JJ, Jr., Cook JJ, Sitko GR, Holahan MA, Ramjit DR, Mellott MJ, et al. Nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. 5. Antithrombotic effects of MK-0383. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 1995;272:20-32.
- [180] Petitou M, Nancy-Portebois V, Dubreucq G, Motte V, Meuleman D, de Kort M, et al. From heparin to EP217609: the long way to a new pentasaccharide-based neutralisable anticoagulant with an unprecedented pharmacological profile. *Thrombosis and haemostasis*. 2009;102:804-10.
- [181] Prandoni P, Tormene D, Perlati M, Brandolin B, Spiezia L. Idraparinux: review of its clinical efficacy and safety for prevention and treatment of thromboembolic disorders. *Expert opinion on investigational drugs*. 2008;17:773-7.
- [182] Savi P, Herault JP, Duchaussoy P, Millet L, Schaeffer P, Petitou M, et al. Reversible biotinylated oligosaccharides: a new approach for a better management of anticoagulant therapy. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2008;6:1697-706.
- [183] Labinaz M, Ho C, Banerjee S, Martin J, Chen S, Mensinkai S. Meta-analysis of clinical efficacy and bleeding risk with intravenous glycoprotein IIb/IIIa antagonists for percutaneous coronary intervention. *The Canadian journal of cardiology*. 2007;23:963-70.
- [184] Lele M, Sajid M, Wajih N, Stouffer GA. Eptifibatide and 7E3, but not tirofiban, inhibit alpha(v)beta(3) integrin-mediated binding of smooth muscle cells to thrombospondin and prothrombin. *Circulation*. 2001;104:582-7.
- [185] Mehran R, Nikolsky E, Camenzind E, Zelizko M, Kranjec I, Seabra-Gomes R, et al. An Internet-based registry examining the efficacy of heparin coating in patients undergoing coronary stent implantation. *American heart journal*. 2005;150:1171-6.
- [186] Bangalore S, Vlachos HA, Selzer F, Wilensky RL, Kip KE, Williams DO, et al. Percutaneous coronary intervention of moderate to severe calcified coronary lesions: insights from the National Heart, Lung, and Blood Institute Dynamic Registry. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2011;77:22-8.
- [187] Heleen M. M. van Beusekom M, PhD, Deirdre M. Whelan, BSc, Monique van de Plas, MD, and Willem J. van der Giessen, PhD. A practical and rapid method of histological processing for examination of coronary arteries containig metallic stents. *Cardiovascular Pathology*. 1996;5:69-76.

Bibliographie

- [188] Finn AV, Gold HK, Tang A, Weber DK, Wight TN, Clermont A, et al. A novel rat model of carotid artery stenting for the understanding of restenosis in metabolic diseases. *Journal of vascular research*. 2002;39:414-25.
- [189] Takeda Y, Takeno M, Iwasaki M, Kobayashi H, Kirino Y, Ueda A, et al. Chemical induction of HO-1 suppresses lupus nephritis by reducing local iNOS expression and synthesis of anti-dsDNA antibody. *Clinical and experimental immunology*. 2004;138:237-44.
- [190] Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, et al. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovascular research*. 2005;68:483-92.
- [191] O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2000;267:5421-6.
- [192] Hyvelin JM MB, Uzbekov R, Motterlini R, Lermusiaux P. Hemin prevents in-stent stenosis in rat and rabbit models by inducing heme-oxygenase-1. *Journal of vascular surgery*. 2010;51:417.
- [193] MAUREL B, CHAI F, MATON M, BLANCHEMAIN N, HAULON S. IN STENT RESTENOSIS ASSESSMENT AFTER EP224283 INJECTION IN A RAT MODEL. *Atherosclerosis*. 2012;Under review.
- [194] Kapturczak MH, Wasserfall C, Brusko T, Campbell-Thompson M, Ellis TM, Atkinson MA, et al. Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse. *The American journal of pathology*. 2004;165:1045-53.
- [195] Gennaro G, Menard C, Giasson E, Michaud SE, Palasis M, Meloche S, et al. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2003;23:204-10.
- [196] Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, et al. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nature medicine*. 2001;7:693-8.
- [197] VIDAL. NORMOSANG 25 mg/ml sol inj p perf. *Le Dictionnaire Vidal2012*.
- [198] Day SM, Reeve JL, Pedersen B, Farris DM, Myers DD, Im M, et al. Macrovascular thrombosis is driven by tissue factor derived primarily from the blood vessel wall. *Blood*. 2005;105:192-8.
- [199] Kroll MH, Harris TS, Moake JL, Handin RI, Schafer AI. von Willebrand factor binding to platelet GpIb initiates signals for platelet activation. *The Journal of clinical investigation*. 1991;88:1568-73.
- [200] Wang K, Zhou X, Zhou Z, Mal N, Fan L, Zhang M, et al. Platelet, not endothelial, P-selectin is required for neointimal formation after vascular injury. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25:1584-9.

Bibliographie

- [201] Moliterno DJ, Committee TS, Investigators. A randomized two-by-two comparison of high-dose bolus tirofiban versus abciximab and unfractionated heparin versus bivalirudin during percutaneous coronary revascularization and stent placement: the tirofiban evaluation of novel dosing versus abciximab with clopidogrel and inhibition of thrombin (TENACITY) study trial. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2011;77:1001-9.
- [202] Faxon DP, Spiro TE, Minor S, Cote G, Douglas J, Gottlieb R, et al. Low molecular weight heparin in prevention of restenosis after angioplasty. Results of Enoxaparin Restenosis (ERA) Trial. *Circulation.* 1994;90:908-14.
- [203] Lablanche JM, McFadden EP, Meneveau N, Lusson JR, Bertrand B, Metzger JP, et al. Effect of nadroparin, a low-molecular-weight heparin, on clinical and angiographic restenosis after coronary balloon angioplasty: the FACT study. *Fraxiparine Angioplastie Coronaire Transluminale.* *Circulation.* 1997;96:3396-402.
- [204] Kiesz RS, Buszman P, Martin JL, Deutsch E, Rozek MM, Gaszewska E, et al. Local delivery of enoxaparin to decrease restenosis after stenting: results of initial multicenter trial: Polish-American Local Lovenox NIR Assessment study (The POLONIA study). *Circulation.* 2001;103:26-31.
- [205] Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in biotechnology.* 2004;22:80-6.
- [206] Mironov V, Kasyanov V, McAllister K, Oliver S, Sistino J, Markwald R. Perfusion bioreactor for vascular tissue engineering with capacities for longitudinal stretch. *The Journal of craniofacial surgery.* 2003;14:340-7.
- [207] Yazdani SK, Berry JL. Development of an in vitro system to assess stent-induced smooth muscle cell proliferation: a feasibility study. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR.* 2009;20:101-6.
- [208] Yazdani SK, Tillman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL. The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg.* 2010;51:174-83.
- [209] Conklin BS, Surowiec SM, Lin PH, Chen C. A simple physiologic pulsatile perfusion system for the study of intact vascular tissue. *Medical engineering & physics.* 2000;22:441-9.
- [210] Voigt EE. *Hydrodynamic Characterization of an Arterial Flow Bioreactor.* Blacksburg, Virginia, USA2010.
- [211] Guerin P, Goueffic Y, Heymann MF, Pillet P, Al Habash O, Crochet D, et al. Direct stenting limits sirolimus-eluting stent edge neointimal thickening. *J Vasc Surg.* 2007;46:354-9.
- [212] Guerin P, Sauzeau V, Rolli-Derkinderen M, Al Habbash O, Scalbert E, Crochet D, et al. Stent implantation activates RhoA in human arteries: inhibitory effect of rapamycin. *Journal of vascular research.* 2005;42:21-8.

Bibliographie

[213] Maurel B, Sarraf C, Lermusiaux P, Bakir F. BANC DE TEST POUR STENT. In: ARTS, editor. http://frespacenetcom/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20120928&DB=frespacenetcom&locale=fr_FR&CC=FR&NR=2973146A1&KC=A1. France: FR 2973146; 2012.

[214] Chong CK, How TV, Harris PL. Flow visualization in a model of a bifurcated stent-graft. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists*. 2005;12:435-45.

[215] Jean-Baptiste E. Amélioration des propriétés antibactériennes et anticoagulantes des prothèses vasculaires en polyester par immobilisation et libération contrôlée de principes actifs: Université Lille Nord de France; 2012.

TABLE DES MATIERES

Introduction générale.....	2
CHAPITRE 1 : Revue de littérature.....	5
1. Généralités.....	6
1.1. Historique de la circulation sanguine.....	6
1.2. Physiologie de la circulation artérielle.....	9
1.2.1. Artères coronaires	9
1.2.2. Artères infra-poplités.....	10
1.3. Histologie de la paroi artérielle.....	11
1.3.1. L'intima.....	11
1.3.2. La média.....	13
1.3.3. L'adventice.....	14
1.4. L'athérosclérose.....	14
1.4.1. Physiopathologie de l'athérosclérose	15
1.4.1.1. Lésions histologiques de l'athérosclérose	15
1.4.1.2. Mécanismes cellulaires impliqués dans l'athérosclérose	18
1.4.1.3. Contraintes de cisaillement	21
1.4.1.4. Facteurs déclenchant d'athérosclérose	22
1.4.2. Retentissement clinique de l'athérosclérose	23
2. Endoprothèses vasculaires.....	24
2.1. Historique.....	24
2.2. Enjeux économique et sociétaux.....	27
2.3. Stents nus	29
2.3.1. Généralités.....	29
2.3.2. Réponse physiologique à l'implantation d'un stent	31
2.3.3. Resténose intra stent.....	32
2.3.3.1. Facteurs mécaniques impliqués dans la resténose intra stent.....	33
2.3.3.2. La phase précoce	34
2.3.3.3. La phase tardive.....	35
2.3.4. Analyse cellulaire et moléculaire de la resténose intra-stent durant la phase tardive.....	37
2.4. Les stents actifs.....	39
2.4.1. Généralités.....	39
2.4.1. La thrombose aiguë tardive	41
2.4.1.1. Défaut de cicatrisation de la paroi vasculaire.....	42
2.4.1.2. Réactions d'hypersensibilité au polymère.....	43
2.4.1.1. Conclusion sur l'utilisation actuelle des stents actifs.....	44
2.5. Traitement antiagrégant plaquettaire	45
2.6. Actualité de la recherche sur les nouveaux stents actifs	46
2.6.1. Polymères bio-résorbables, stents bio-résorbables et stents actifs sans polymères	46

Table des matières

2.6.2. Stents pro-cicatrisants	48
2.6.3. Stents imprégnés d'anticoagulants ou d'antiagrégants	50
3. Les modèles d'étude de la resténose intra-stent	50
3.1. Les modèles d'étude <i>in vivo</i>	51
3.1.1. Modèles murins	51
3.1.2. Modèle chez le lapin	52
3.1.3. Modèle chez le porc	52
3.1.4. Problématique des modèles animaux	53
3.2. Modèles d'étude <i>ex vivo</i>	54
4. Conclusion	54
CHAPITRE 2 : étude <i>in vivo</i> de nouvelles molécules thérapeutiques pour réduire la resténose intra-stent	55
1. Généralités sur les molécules étudiées	56
1.1. L'Hémine : un inducteur et substrat de l'Hème Oxygénase 1	56
1.2. EP224283 : un nouvel agent anti-thrombotique	58
1.2.1. Propriétés de EP224283	59
1.2.2. Effet des molécules anti GP IIb/IIIa après implantation d'un stent	60
1.2.3. Effet des molécules anti facteur Xa après implantation d'un stent	61
1.3. Hypothèses de travail.....	61
2. Matériels et méthodes	62
2.1. Modèles animaux de resténose intra stent	63
2.1.1. Le rat	63
2.1.2. Le lapin hypercholestérolémique	64
2.2. Méthodes d'analyse des artères stentées.....	65
2.2.1. Etude histomorphométrique par microscopie optique	65
2.2.2. Etude en Microscopie Electronique	66
2.2.3. Western blot et Antibody Array	67
2.3. Administration <i>in vivo</i> des molécules étudiées.....	68
2.3.1. Biodisponibilité et Bioactivité.....	68
2.3.2. Répartition des lots expérimentaux d'animaux et des traitements administrés	70
2.3.2.1. Expérimentation avec l'Hémine.....	70
2.3.2.2. Expérimentation avec EP224283	72
2.4. Analyse <i>in vitro</i> de la cytotoxicité des molécules étudiées.....	73
2.5. Analyse statistique	73
3. Résultats.....	74
3.1. Analyse histomorphométrique a J28.....	74
3.1.1. Traitement par l'Hémine	74
3.1.2. EP224283	76
3.2. Analyse en microscopie électronique de la ré-endothélialisation du stent après traitement par hémine chez le rat et le lapin	78

Table des matières

3.3. Analyse des mécanismes protéiques régulateurs de la prolifération cellulaire chez le rat	80
3.3.1. Effet de l'Hémine sur l'expression des protéines impliquées dans la resténose	80
3.3.1. Effet de EP224283 sur l'expression des protéines impliquées dans la resténose	82
3.4. Rôle de l'hème oxygénase-1 et de l'action anti GP IIb / IIIa dans la protection contre la resténose intra-stent	85
3.4.1. Rôle de l'hème oxygénase-1 et de ses produits de dégradation	85
3.4.2. Rôle du mécanisme anti GP IIb / IIIa dans la resténose.....	87
3.5. Effet <i>in vitro</i> des molécules étudiées sur la viabilité cellulaire	88
3.5.1. Effet de l'Hémine	88
3.5.2. Effet de EP224283	88
4. Discussion.....	89
4.1. Discussion des expérimentations sur l'hémine	91
4.2. Discussion des expérimentations sur EP224283.....	94
4.3. Limites de ces travaux	96
5. Conclusion	96
CHAPITRE 3 : Modèles d'étude ex vivo de la resténose intra-stent	98
1. Introduction	99
2. Étude <i>Ex Vivo</i> statique des effets de l'hémine sur des artères coronaires et infra-poplités stentées d'origine humaine	101
2.1. Matériel et méthodes.....	101
2.2. Résultats	103
2.3. Discussion	106
3. Élaboration d'un Bioréacteur, nouveau modèle d'étude <i>Ex Vivo</i> Hémodynamique de Resténose Intra-Stent.....	106
3.1. Objectifs scientifiques du bioréacteur.....	107
3.2. Méthodologie	108
3.2.1. Cahier des charges du Bioréacteur	108
3.2.2. Plan du bioréacteur.....	110
3.2.1. Validation du modèle <i>Ex Vivo</i> de resténose intra stent	110
3.3. Resultats	112
3.3.1. Prototype	112
3.3.2. Bioreacteur	112
3.4. Discussion	114
3.5. Conclusion	116
Conclusion et perspectives de recherche.....	117
Bibliographie.....	119
Table des matières.....	137

Table des matières

Table des illustrations.....	141
Production scientifique.....	145
Abstract and key words	147

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Fig. 1 : Expérience du garrot. La compression du bras par un garrot peu serré en fait ressortir les veines de l'avant-bras et entraîne le gonflement des valvules en aval du garrot (1). La pression du doigt sur la veine dilatée en force le sang à évacuer la veine entre le point où l'on appuie et la valvule suivante située en direction du cœur (2). <i>Guilielmi HARVEI ANGLI - Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus, 1628.</i>	8
Fig. 2 : Anatomie coronarienne	10
Fig. 3 : Stades évolutifs de l'athérome selon l'American Heart Association [15, 16].	17
Fig. 4 : Exemples de segments artériels venant d'ultra-sons intravasculaires et d'histologie virtuelle démontrant les modifications de la plaque selon une force de cisaillement faible (gauche), intermédiaire (au centre) ou élevée (à droite) selon Samady <i>et al.</i> [37].	22
Fig. 5 : René Leriche entouré de ses élèves, notamment Mickael DeBakey, Jean Cid Dos Santos, René Fontaine et Jean Kunlin.....	24
Fig. 6 : E. Zeitler, A. Gruntzig et C. Dotter (de gauche à droite), pionniers du traitement endovasculaire des oblitérations artérielles.....	26
Fig. 7 : Évolution des ventes de stent actif entre 2006 et 2011.....	28
Fig. 8 : Configuration des stents en cellules ouvertes ou fermées selon Hara <i>et al.</i> [59]	30
Fig. 9 : Stent de seconde génération en cobalt-chrome.....	31
Fig. 10 : Majoration de l'hyperplasie néointimale lors de la présence d'une effraction de la média (A, flèches) comparativement à l'intégrité de la limitante élastique interne (B). La rupture de la média entraîne une majoration de l'inflammation de la néointima (C) comparativement au maintien de l'intégrité de la média (D) selon Farb <i>et al.</i> [65].	34
Fig. 11 : Cascades de signalisation impliquées dans le changement de phénotype des cellules musculaires lisses vasculaires d'après Muto <i>et al.</i> [81].	37
Fig. 12 : Effet du sirolimus et du paclitaxel sur le cycle cellulaire.	41

Table des illustrations

<p>Fig. 13 : Fissuration de polymère étudié en microscopie électronique à balayage après déploiement de stent actif en milieu salin à 37°C selon Otsuka <i>et al.</i> [125].</p>	45
<p>Fig. 14 : Structure chimique de l'hémine (C₃₄H₃₂ClFeN₄O₄) ; masse molaire : 651,96 g/mol ; N° CAS : 16009-13-5.</p>	58
<p>Fig. 15 : Structure chimique de EP224283.</p>	59
<p>Fig. 16 : Implantation des stents chez le lapin sous contrôle radioscopique par voie carotidienne.</p>	65
<p>Fig. 17 : Coupe transversale caractéristique d'aorte de rat stentée, analysée en microscopie optique (x5) puis numérisée.</p>	66
<p>Fig. 18: Coupes transversales caractéristiques d'aortes de rats stentées chez les rats témoins, traités à l'hémine, et implantés avec un stent actif au sirolimus. La quantification de l'hyperplasie néointimale par la mesure du ratio néointima/média (n/m) dans les différents groupes montrait une réduction significative de 30% d'hyperplasie néointimale chez les rats traités à l'hémine comparativement aux témoins. La réduction de 46% de formation de néointima lors de l'implantation d'un stent actif permettait la validation du modèle.</p>	75
<p>Fig. 19 : A : Artériographies caractéristiques à J28 de la bifurcation aorto-iliaque chez un lapin témoin et chez un lapin hémine. B : Coupes transversales caractéristiques iliaques de lapins témoin, hémine, stent actif, et quantification du ratio néointima/média (n/m) montrant une réduction significative de néointima (48%) chez les lapins hémine comparativement aux témoins.</p>	76
<p>Fig. 20 : Coupes transversales caractéristiques de 2 rats témoins montrant une sténose intra stent focale.</p>	77
<p>Fig. 21 : Sections transversales caractéristiques d'aorte de rat témoin et traité à EP224283 à J28 de l'implantation du stent, ainsi que la quantification du ratio néointima/média (n/m) montrant une réduction significative de 20% de l'hyperplasie néointimale après traitement par EP224283. ***p<0,001.</p>	77
<p>Fig. 22 (page suivante) : A : Analyse de la couche cellulaire à l'interface entre la maille et le sang chez le rat avec analyse de l'ultrastructure cellulaire en MET montrant des gap-jonctions. B : Marquage immunogold de CD31 caractéristique des cellules endothéliales chez le rat. Grossissement successif et analyse du marquage sur la cellule. C : Analyse de la proportion de recouvrement des mailles du stent en MEB chez le rat. D : Quantification de l'épaisseur de néointima au sommet des mailles chez le lapin en MET. E : Évaluation du recouvrement des mailles chez le lapin.</p>	78
<p>Fig. 23 : Effet du traitement par l'hémine sur l'expression protéique à J7. A : Expression des cytokines inflammatoires. B : Expression des protéines impliquées</p>	

Table des illustrations

dans la prolifération cellulaire et sa régulation, ainsi que dans la migration et l'apoptose. Chaque puits représente 1 rat.....	81
Fig. 24 : Effet du traitement par hémine à J28 sur l'expression des protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation, ainsi que sur la migration et l'apoptose. Chaque puits représente 1 rat. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$	83
Fig. 25 : Effet du traitement par EP224283 à J7 sur les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et sa régulation. Chaque puits représente un rat. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$	84
Fig. 26 : Effet du traitement par EP224283 à J28 sur les protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et dans sa régulation montrant une atténuation des mécanismes de prolifération dans les 2 groupes comparativement à J7. Chaque puits représente un rat.....	85
Fig. 27 : Effet de l'inhibition de l'HO-1 (SnPP) et d'un donneur de CO sur le développement de la resténose intra-stent par analyse histomorphométrique. Sections d'aortes stentées caractéristiques par groupe, et représentation de l'hyperplasie intimale par la mesure du ratio n/m. * $p < 0,05$	86
Fig. 28 : Effet d'un traitement par EP37122, contenant uniquement une biotine et la molécule idraparinux, sur la resténose à J28. Coupes transversales caractéristiques de chaque groupe et quantification du ratio néointima/média (n/m) ne mettant pas en évidence de différence significative entre les deux groupes.	87
Fig. 29 : Effet <i>in vitro</i> de concentrations croissantes d'hémine sur la viabilité des cellules endothéliales et musculaires lisses.	88
Fig. 30 : Effet <i>in vitro</i> de concentrations croissantes de EP224283 sur la viabilité des cellules endothéliales et musculaires lisses.	89
Fig. 31 : Grossissement x10 au contact d'une maille sur une coupe transversale d'artère coronaire du groupe témoin.	103
Fig. 32 : Grossissement x 5 d'une artère coronaire du groupe témoin non stentée.....	104
Fig. 33 : Sections transversales caractéristiques d'artères coronaires et analyse morphométrique.	104
Fig. 34 : Sections transversales caractéristiques d'artères tibiales antérieures et analyse morphométrique par groupe.....	105
Fig. 35 : Schéma et fonctionnement de la pompe centrifuge et interface de commande labview permettant l'ajustement des consignes de pression et fréquence, et l'enregistrement des données. Les pulsations de flux sont modulées par la vitesse de rotation de la roue. P=pression ; N=nombre de tour minute ; f=fréquence ; t=temps.....	109

Table des illustrations

Fig. 36 : plan du bioréacteur 2D ou 3D et plan de l'armoire métallique permettant son logement sur 3 étages dans l'incubateur.	111
Fig. 37 : Prototype du bioréacteur ayant démontré la faisabilité de reproduire un flux systolo-diastolique. A : pompe centrifuge ; B : réservoir ; C : artères factices ; D : débitmètre ; E : capteur de pressions.	112
Fig. 38 : Fonctionnement sur 8 heures du bioréacteur avec des artères en plastiques. A : pompe centrifuge. B : bac de réservoir de liquide circulant permettant les variations de débit. C : Bac de culture tissulaire avec les 6 artères en plastiques branchées en dérivation. D : Bac de culture tissulaire et son couvercle avec son système anti débordement qui interrompt la pompe s'il détecte une fuite.	113
Fig. 39 : Fonctionnement du bioréacteur avec 3 aortes thoraciques de rat branchées en dérivation dans le circuit. A : Montage sous hotte stérile du bioréacteur B: Et séparation de la plateforme contenant les le bac de culture pour la mise en place des artères C: Après 2 heures de fonctionnement et augmentation de la pression, constatation d'une fuite sur un prélèvement.	114

TABLEAU

Tableau 1 : Caractéristiques des différents stents actifs.	42
---	----

DIAGRAMMES

Diagramme 1 : Répartition des animaux tests pour l'hémine. MO : microscopie optique ; ME : microscopie électronique ; WB : western blot ; J : nombre de jours après implantation ; st. : stent ; s ϕ : sérum physiologique ; ip : injection par voie intrapéritonéale.	71
Diagramme 2 : Répartition des animaux tests pour EP224283. MO : microscopie optique ; WB : western blot ; J : nombre de jours après implantation ; st. : stent ; s ϕ : sérum physiologique ; sc : injection par voie sous cutanée.	72

PRODUCTION SCIENTIFIQUE

PRIX

- ✓ Prix BELGRAND-CHEVASSU de l'Académie Nationale de Médecine. Domaine : Chirurgie et spécialités chirurgicales. Décerné à un travail chirurgical original ayant pour base des recherches d'anatomie pathologique. (Décision de l'Académie Nationale de Médecine du 3.7.1973). Lauréat 2008 : **MAUREL Blandine**
- ✓ Prix spécial des chirurgiens de l'avenir 2008. Récompensant le travail « L'induction de l'hème oxygénase-1 réduit l'hyperplasie myointimale induite par un stent dans l'aorte de rat ».

REVUES SCIENTIFIQUES A COMITE DE LECTURE

- ✓ *Hemin prevents in-stent stenosis in rat and rabbit models by inducing heme-oxygenase-1.* Hyvelin JM, **Maurel B**, Uzbekov R, Motterlini R, Lermusiaux P. J Vasc Surg. 2010 Feb;51(2):417-28
- ✓ *In stent restenosis assessment after EP224283 injection in a rat model.* **Maurel B**, Chai F, Maton M, Blanchemain N, Haulon S. Atherothrombosis. ATH-D-12-01144. Under review.

BREVET D'INVENTION

- ✓ BANC DE TEST POUR STENT.
Dépôt le 25 mars 2011 auprès de l'INPI. N° de dépôt : 11 52511. Pas d'extension. France: FR2973146.
Désignation des inventeurs : **Mme Maurel**, M. Sarraf, M. Bakir, M. Lermusiaux.
http://frespacenetcom/publicationDetails/biblio?FT=D&date=20120928&DB=frespacenetcom&locale=fr_FR&CC=FR&NR=2973146A1&KC=A1.

COMMUNICATIONS ORALES SELECTIONNEES SUR RESUME

- ✓ *Heme oxygenase-1 induction prevents in-stent restenosis in rat and rabbit models.*
Maurel B, Lermusiaux P, Hyvelin JM. ESVB 2009. May 13-15th, 2009. Strasbourg, France.

POSTERS

- ✓ *Intra stent restenosis : what are the effects of heme oxygenase-1 induction ?*
B. Maurel, D. Antier, P. Lermusiaux, JM. Hyvelin. Endocoronary Biomechanics Research Symposium. April 10-11, 2008. Marseille, France. Poster ayant fait l'objet d'une présentation orale.
- ✓ *Effets de l'hémine sur l'hyperplasie myointimale intra-stent chez le rat.*
B Maurel, P Lermusiaux, D Antier, JM Hyvelin. Printemps de la Cardiologie. 28-29 Mai 2008, Montpellier, France. Poster ayant fait l'objet d'une présentation orale.
- ✓ *Hemin prevents in stent restenosis in rat and rabbit models: heme oxygenase-1 as a new therapeutic target to prevent restenosis.*
B Maurel, R Uzbekov, R Motterlini, V Eder, P Lermusiaux, JM Hyvelin. 26ème Congrès Annuel du GRRC. 2-3 avril 2009. Nancy. France.

DOTATIONS DE RECHERCHE

- ✓ Dotation de Recherche de l'Institut de l'Athérombose. Mars 2008. Montant : 24 000 €. Projet : *Hyperplasie myointimale intra-stent : effet de l'induction de l'hème oxygénase-1.*
- ✓ Dotation de Recherche 2008-2009 de la Société de Chirurgie Vasculaire de langue Française. Montant : 9 500 €. Projet : *Artères coronaires et artères de jambe : différences physiologiques et conséquences sur la resténose intra-stent.*
- ✓ Dotation de Recherche 2010-2011 de la Société de Chirurgie Vasculaire de langue Française. Montant : 10 700 €. Projet : *Fabrication d'un bioréacteur pour l'étude de la resténose intra-stent et la mise au point des stents actifs pro-cicatrisants.*

ABSTRACT AND KEY WORDS

In-Stent Restenosis: *In vivo* evaluation of new drugs and development of an *ex vivo* model.

INTRODUCTION

In stent restenosis (ISR) is a major complication of endovascular treatment due to an excessive healing of the arterial wall. Drug eluting stents (DES) reduce the rate of ISR but expose to late stent thrombosis, related to a delayed or incomplete healing of the arterial wall, and also to hypersensitivity reactions induced by the polymer. Several teams are working on new “pro-healing” DES, free polymer coated or releasing new drugs, to reduce ISR without impeding the re-endothelialization of the stent struts. Stent implantation induces a mechanical injury to the arterial wall, inducing platelet aggregation and inflammatory response, leading to vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation and migration. This aberrant VSMC growth with synchronized extracellular matrix synthesis leads to ISR. Hemin is a potent heme-oxygenase 1 inducer and substrate that releases carbon monoxide and has anti-proliferative and anti-inflammatory effects. EP224283 is a new dual-action antithrombotic molecule, combining a GPIIb/IIIa antagonist and a factor Xa inhibitor. Currently animal models are mandatory to investigate ISR as there is no reliable *in vitro* model. Nevertheless, these models are often far from human ISR, because of the underlying atherosclerosis process. They are also not suitable for testing DES because several experimentations and multiple samples are required. In this work, we assess the effects of two new therapeutic molecules to reduce ISR, hemin and EP224283, and we developed a new *in vitro* model of ISR, reproducing a hemodynamic and biological physiological environment.

METHODS AND RESULTS

***In vivo* analysis.** In stent restenosis models were stent implantation in rat abdominal aorta or in hypercholesterolemic rabbit iliac arteries. Seven or 28 days after stent implantation, the stented arteries were removed and either frozen for protein analysis or placed in fixative for morphological analysis with optical or electronical microscopy. Animals received hemin

Abstract and key words

intraperitoneally or EP224283 subcutaneously every 48 hours. Control animals received saline. Histomorphological analysis at day 28 revealed that in the hemin treated group, the extent of neointima area was significantly reduced compared to the control group. A 30% decrease was observed in rats and 40% in rabbit. Endothelial coverage in electronic microscopy was similar in hemin-treated rats and rabbit when compared to their controls. The protein analysis in rats revealed that hemin limited the early inflammatory response and cellular mechanisms implicated in VSMC proliferation (ERK1/2 and p21 p27), in VSMC migration (RhoA) and reduce apoptosis. At day 28, EP224283 significantly reduced neointima growth around 20% in rats. Protein analysis revealed that EP224283 reduced vascular smooth muscle cells proliferation pathways: both ERK1/2 and Akt activated form were down-regulated in the treated rats, and p38 activated form were up-regulated. Expression of Ki67 was also reduced in both hemin and EP224283 treated group, indicating a reduced proliferation of vascular cells.

***Ex vivo* experiments.** In association with ParisTech, we developed a bioreactor for *ex vivo* study of ISR, providing physiologic pulsatile flow. This bioreactor will be a major tool in the research on future pro-healing DES. The bioreactor will allow: to perform numerous blood samples; study several stents at the same time; analyze flows and their effects on ISR; work directly with human arteries, collected during organ donation; and reduce the need for animal experimentation.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

This work demonstrated the significance of two new therapeutic molecules to prevent ISR, hemin and EP224283. Both reduced ISR without stopping the physiological healing of the arterial wall. We developed a bioreactor providing physiological and hemodynamical conditions. It will be a useful tool for the development of new DES. Our perspectives are now to create a new drug eluting stent releasing hemin or EP224283, as well as to validate our novel *ex vivo* hemodynamic model of ISR, in order to test our new DES in both animal models and *ex vivo* hemodynamic conditions.

KEY WORDS : In stent restenosis ; drug eluting stent ; atherosclerosis ; hemin ; CO donor ; EP224283 ; Idraparinux ; tirofiban ; bioreactor.

RESUME ET MOTS CLEFS

Resténose Intra-Stent : Evaluation De Nouvelles Thérapeutiques *In Vivo* Et Elaboration D'un Modèle *Ex Vivo* Hémodynamique

INTRODUCTION

La resténose intra-stent (RIS) est une complication importante du traitement endovasculaire des sténoses et occlusions artérielles dont l'incidence est réduite par les stents actifs. Ces derniers entraînent un retard de cicatrisation de la paroi vasculaire et parfois une réaction d'hypersensibilité au polymère, pouvant être responsable d'une thrombose aigue tardive. Plusieurs équipes travaillent donc à l'élaboration de nouveaux stents, libérant de nouvelles molécules, sans polymère ou biorésorbables. Les mécanismes précoces impliqués dans la RIS sont une agrégation plaquettaire et une réaction inflammatoire, entraînant une prolifération et une migration des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de la média vers la néointima. Cette croissance aberrante des CMLV associée à la production de matrice extracellulaire a pour conséquence la RIS. L'hémine est un inducteur et substrat de l'hème oxygénase-1 (HO-1), une enzyme libératrice de monoxyde de carbone qui régule de nombreuses fonctions cellulaires anti-inflammatoires et anti-prolifératives. EP224283 est un nouvel anti-thrombotique possédant une double activité anti-agrégante plaquettaire (anti GPIIbIIIa) et anticoagulante (antiX_A). En raison de l'absence de modèle *ex vivo* validé, le modèle animal est actuellement obligatoire pour l'étude de la RIS. Ces modèles posent des problèmes éthiques et ne permettent pas une étude satisfaisante des stents actifs en raison de l'impossibilité d'effectuer des prélèvements réguliers. Le but de ce travail est d'une part l'exploration de deux nouvelles cibles thérapeutiques dans la RIS, l'hémine et EP224283, et d'autre part la mise au point d'un bioréacteur pour l'étude *ex vivo* hémodynamique de la RIS.

METHODES ET RESULTATS

Analyse *in vivo*. Les modèles de RIS utilisés étaient le stenting d'aorte de rat et le stenting d'artères iliaques de lapins hypercholestérolémiques. Sept ou 28 jours après l'implantation du stent, les artères stentées étaient prélevées puis soit incluses en résine pour analyse morphologique, soit congelées pour analyse de l'expression protéique. L'hémine était administrée par voie intrapéritonéale et EP224283 par voie sous cutanée toutes les 48 heures. Les témoins recevaient du sérum physiologique. L'analyse histomorphométrique après traitement par hémine montrait une réduction significative de 30% de la formation de néointima chez le rat et de 48% chez le lapin. La ré-endothélialisation des mailles du stent, analysée en microscopie électronique, était comparable à celle des témoins. L'analyse protéique montrait chez les rats traités par hémine : une réduction de l'expression des cytokines inflammatoires et des protéines impliquées dans la prolifération et la migration des CMLV (ERK1/2 et RhoA), associée à une augmentation de l'expression des protéines régulatrices de la prolifération (p21 et p27), et une réduction de l'apoptose. L'analyse histomorphométrique montrait chez les rats traités par EP224283 une réduction significative de formation de néointima de 20%. L'analyse protéique montrait une réduction de l'expression des protéines impliquées dans la prolifération des CMLV (ERK1/2 et Akt) associée à une augmentation de la forme active de p38, régulatrice de la prolifération. L'expression de Ki67 était réduite chez l'ensemble des rats traités témoignant d'une réduction de prolifération cellulaire

Analyse *ex vivo* : En partenariat avec l'ENSAM (Paris), nous avons confectionné et breveté un bioréacteur pour l'étude *ex vivo* de la RIS en conditions hémodynamiques et biologiques semblables au vivant. Ce bioréacteur fait circuler un flux pulsé dans 6 artères branchées en dérivation et immergées dans du milieu de culture cellulaire. Ce circuit est logé dans un incubateur afin de maintenir les tissus vivants durant l'expérimentation. Son objectif est d'affiner l'étude des nouveaux stents actifs par la possibilité de prélèvements multiples, d'analyser les écoulements, de travailler avec des artères humaines (prélevées lors de dons d'organes) et de s'affranchir en partie du modèle animal.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ces travaux montrent l'intérêt de deux nouvelles molécules thérapeutiques dans la RIS. Celles-ci limitent la prolifération cellulaire sans empêcher la cicatrisation de la paroi vasculaire. Notre modèle d'étude *ex vivo* hémodynamique de la RIS n'a jamais été décrit dans la littérature et permettra une analyse précise des nouveaux stents. Ce modèle va réduire le recours à l'expérimentation animale. Nos travaux futurs comprendront la mise au point de nouveaux stents actifs à l'hémine et à EP224283, ainsi que la validation et l'exploitation du modèle de RIS hémodynamique *ex vivo*.

MOTS-CLES

Resténose intra-stent ; stent actif ; athérosclérose ; hémine ; CO ; EP224283 ; idraparinux ; tirofiban ; bioréacteur.