

**Université de Lille Nord de France
Ecole Doctorale Biologie Santé
UFR de Médecine**

THESE

Pour l'obtention du grade de docteur d'Université
Discipline : Recherche clinique, Innovation technologique, Santé publique
Spécialité : Chirurgie vasculaire

Présenté et soutenu publiquement

Le 20 décembre 2013

Par

Jonathan SOBOCINSKI

**FONCTIONNALISATION DE STENTS VASCULAIRES PAR DES MATRICES
POLYMERES CONTENANT DES MOLECULES BIOACTIVES**

Prof. Stéphane HAULON Directeur

Prof. Nabil CHAKFE Rapporteur

Prof. Eric STEINMETZ Rapporteur

Prof. Réda HASSEN-KHODJA Examineur

Dr. Nicolas BLANCHEMAIN Examineur

Dr. Joël LYSKAWA Examineur

AVANT-PROPOS

Ce travail résulte d'une collaboration et d'une réflexion multidisciplinaires impliquant deux unités de recherche : l'unité INSERM U1008, dirigée par le Professeur J. SIEPMANN de l'université de Lille 2 dédiée aux médicaments et aux biomatériaux à libération contrôlée, et l'Unité des Matériaux et Transformation (UMET) UMR CNRS 8207 – Ingénierie des Systèmes Polymères de l'Université de Lille 1, dirigée par le Professeur A. LEGRIS.

Ce travail ne serait pas possible sans le soutien de l'industrie : merci à CookMedical Aortic Intervention, ainsi qu'à AbbotVascular et son directeur France, M Stéphane Martin.

Ce travail de thèse s'intègre dans les financements des projets Interreg IVa des 2-mers-« MultiDES », OSEO et de la Région Nord-Pas-de-Calais, ainsi que du soutien de la fédération des Biomatériaux et des dispositifs médicaux fonctionnalisés (FED4123).

REMERCIEMENTS

Aux Membres du Jury,

Monsieur le **Professeur Nabil CHAKFE**,
Professeur de Chirurgie Vasculaire,
Chef de service de Chirurgie Vasculaire au CHU de STRASBOURG,
Votre connaissance approfondie sur les biomatériaux vous implique comme une évidence dans ce projet,
Merci de me faire l'honneur de juger ce travail

Monsieur le **Professeur Eric STEINMETZ**,
Professeur de Chirurgie Vasculaire,
Chef de service de Chirurgie Vasculaire au CHU de Dijon,
Merci pour vos conseils judicieux dans mes choix professionnels,
Merci de me faire l'honneur de juger ce travail

Monsieur le **Professeur Réda HASSEN-KHODJA**,
Professeur de Chirurgie Vasculaire,
Chef de service de Chirurgie Vasculaire au CHU de Nice,
Merci de me faire l'honneur de juger ce travail,

Monsieur le **Professeur Stéphane HAULON**,
Professeur de Chirurgie Vasculaire,
Chef de service de Chirurgie Vasculaire au CHU de Lille,
Merci de m'avoir inspiré et soutenu dans ce travail, de l'avoir dirigé avec efficacité et efficacité, d'avoir grandement contribué à ma formation chirurgicale et scientifique ; et pour ta confiance indéfectible. Je te dois beaucoup.

Monsieur le **Docteur Nicolas BLANCHEMAIN**,
Maître de conférences à l'Université de Lille Nord de France,
Inserm U1008,
Merci de m'avoir dirigé avec rigueur et dévouement, pour ton accessibilité et ta disponibilité. J'ai beaucoup appris à ton contact. Sans toi, tout cela n'aurait pas abouti.

Monsieur le **Docteur Joël LYSKAWA**,
Maître de conférences à l'Université de Lille Nord de France,
Unité Matériaux et Transformation - UMR CNRS 8207,
Merci de m'avoir accompagné avec bienveillance, patience et disponibilité dans un domaine où les bases me manquaient trop souvent...

Je voudrais aussi remercier :

Les **Professeurs Patrice WOISEL et Bernard MARTEL** de l'UMET -UMR CNRS 8207 pour m'avoir accueilli toujours avec enthousiasme et m'avoir permis de faire de la chimie au sein de leur laboratoire. Vous avez grandement participé à ces travaux.

Merci d'avoir toujours revu avec justesse, pragmatisme et rigueur scientifique mes différents manuscrits et présentations.

Le **Docteur Hartmut HILDEBRAND**,

Directeur émérite de recherche INSERM pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire de recherches (INSERM U1008) d'abord comme étudiant en Master 2 puis comme doctorant.

Le **Professeur Juergen SIEPMANN** directeur de notre laboratoire pour vos enseignements du mercredi et/ou jeudi.

Le **Docteur Feng CHAI** pour ton encadrement, ta disponibilité et tes enseignements au laboratoire de biologie.

Le **Docteur Ahmed ADDAD** pour ta disponibilité et ton enseignement en microscopie électronique.

Le **Docteur Nicolas Simon et Madame Nicole Lemahieu** de l'Institut de Recherche pour le cancer de Lille pour leur expertise dans l'analyse HPLC des cytotoxiques.

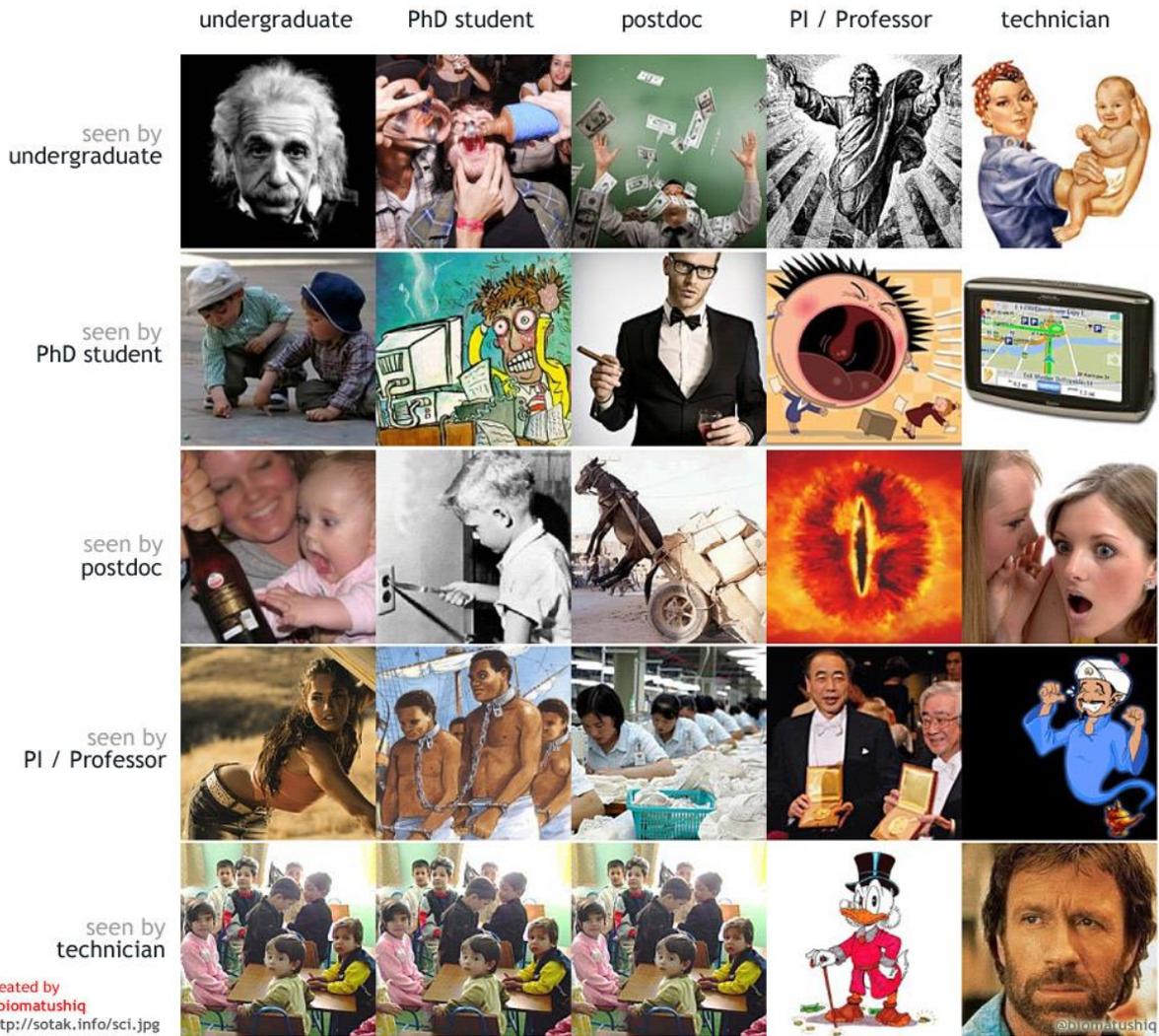
Merci à **Damien Creton**, pour ton enseignement à l'utilisation de la tronçonneuse et de la polisseuse - sans le façonnage de ces 3258 (?) pastilles de Titane et/ou d'Acier et/ou de CoCr rien n'aurait été possible.

L'ensemble des thésards, stagiaires, «post-doc» et assistant ingénieurs de recherches du GRB et de l'UMET en particulier Cédric Zobrist avec qui j'ai partagé mon année de master, Cédric Vermet, Mariam Taha, Elisabeth Courcot, Alessandra Perez, Myriem Gargouri, William Laure, Claudia Flores et François Aubert. Sans oublier Mickael Maton, ingénieur d'étude au sein du GRB pour ton aide précieuse dans l'exécution des manipulations.

Merci aussi à Monique pour ta bonne humeur.

Illustration Ad-Hoc

How people in science see each other



*Aux 3 femmes qui remplissent ma vie de bonheur : Perrine, Chloé et Milla,
Je vous aime*

NOMENCLATURE

Å	:	Angström
AFM	:	Atomic Force Microscope ou microscope à force atomique
ATRP	:	Atom Transfer Radical Polymerization
βCD	:	β-cyclodextrine
°C	:	degré Celcius
CDs	:	cyclodextrines
CoCr	:	alliage Cobalt / Chrome
CTR	:	acide citrique
DES	:	Drug Eluting Stent ou stent à libération de médicament
DMF	:	diméthylformamide
DP _n	:	degré de polymérisation moyen en nombre
Dopamine-pNAS	:	polymère de NAS intégrant l'ancre dopamine
Dopamine-pNGlu	:	polymère de glucosamine muni de l'ancre dopamine
Dopamine-RAFT	:	ancre dopamine intégrant l'agent de transfert RAFT
EGCM	:	Endothelial Growth Cell Medium
EPC	:	Endothelial Progenitor Cells ou progéniteurs endothéliaux circulants
GPa	:	GigaPascal
GPC	:	Chromatographie par perméation de gel
HAEC	:	Human Aortic Endothelial Cell
HUVEC	:	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
HPMEC	:	Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell
HPLC	:	Chromatographie en phase liquide à haute performance
°K	:	degré Kelvin
MEM	:	Minimum Essential Medium pour MC3T3-E1
MEB	:	Microscopie électronique à balayage
MeβCD	:	2-0-méthyl-β-cyclodextrine
MC3T3-E1	:	Mouse calvarian, cellules ostéoblastiques primaires
N	:	Newton
NAS	:	<i>N</i> -acryloyloxysuccinimide
NEt ₃	:	triéthylamine
NHS	:	<i>N</i> -hydroxysuccinimide
AO	:	acide orange II

PBS	:	Phosphate Buffered Saline, tampon phosphate
PDA	:	polydopamine
PDLLA	:	acide poly-D-L lactique
PET	:	polyester téréphtalate
PLA	:	acide polylactique
PLGA	:	acide poly(lactide-co-glycolique)
PLLA	:	acide poly-L lactique
PCD	:	polymère de cyclodextrines
pNAS	:	polymère d'esters activés
PTX	:	paclitaxel
ppm	:	partie par million
PRC	:	polymérisation radicalaire contrôlée
PVA	:	acide poly(alcool vinylique)
PVDF	:	fluorure de polyvinylidène
RAFT	:	<i>polymérisation</i> par Addition-Fragmentation Réversible par Transfert de chaîne
Rt	:	Room temperature ou température ambiante
TBO	:	Toluidine Blue Ortho
TEA	:	Thromboendartériectomie
THF	:	tétrahydrofurane
UV	:	Ultraviolets
US	:	Ultrasons
V	:	Volt
VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIERES

AVANT-PROPOS	3
REMERCIEMENTS	4
NOMENCLATURE	8
TABLE DES MATIERES	10
1. INTRODUCTION GENERALE.....	15
2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	17
2.1. L’athérosclérose	17
2.2. Revascularisations artérielles	21
2.2.1. Pontages et Thrombo-endarterectomies (TEA) artériels et leurs complications 21	
2.2.2. Principe de l’angioplastie artérielle.....	22
2.3. Le Stent	24
2.3.1. Historique et généralités	24
2.3.2. Fabrication du stent / les matériaux utilisés	24
2.3.3. Fabrication d’un stent.....	25
2.3.4. Le Titane et ses alliages	26
2.3.4.1. Le titane	26
2.3.4.2. Les alliages de titane, le NiTiNOL	27
2.3.5. Alliages de Cobalt-Chrome	27
2.3.6. Acier 316LM	29
2.4. Problématique liées à l’angioplastie et au stenting	29
2.4.1. Thrombose précoce	29
2.4.2. Re-sténose	29
2.5. Inventaire des systèmes expérimentés pour améliorer les résultats cliniques après implantation de stent	31
2.5.1. Généralités et historique	31
2.5.2. Brachythérapie endovasculaire / Stents Radioactifs	32

2.5.3.	Stents barrières	32
2.5.4.	Stents à élution de médicaments	33
2.5.4.1.	Modèles possibles	33
2.5.4.2.	Les matrices polymères.....	34
2.5.4.3.	Molécules thérapeutiques.....	36
2.6.	Limites des systèmes disponibles sur le marché	39
2.7.	But et méthodologie des présents travaux.....	40
3.	Produits, Matériels et Méthodes	41
3.1.	Matériels.....	41
3.2.	Produits et principes actifs	41
3.2.1.	Dopamine	41
3.2.2.	Cyclodextrines, catalyseur et acide citrique	41
3.2.3.	Les principes actifs.....	42
3.2.4.	La glucosamine	42
3.3.	Méthodes	43
3.3.1.	Oxydation des surfaces métalliques	43
3.3.1.1.	Préparation des échantillons	43
3.3.1.2.	Oxydation des échantillons	45
3.3.2.	Fonctionnalisation par immobilisation du principe actif.....	45
3.3.2.1.	Synthèse et caractérisation du <i>N</i> -(3,4-dihydroxyphényléthyl)-2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionamide (= dopamine-RAFT).....	45
3.3.2.2.	Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2- méthylpropionate de benzyle (agent de transfert benzyl-RAFT).....	46
3.3.2.3.	Synthèse et caractérisation du monomère <i>N</i> -acryloyloxysuccinimide (NAS) et des (co)polymères de pNAS (poly(<i>N</i> -acryloyloxysuccinimide)).....	46
3.3.2.3.1.	Monomère de NAS	46
3.3.2.3.2.	Polymère d'esters activés (pNAS).....	47
3.3.3.	Fonctionnalisation par libération du principe actif	48

3.3.3.1.	Greffage de la couche de polydopamine (PDA).	48
3.3.3.2.	<i>Greffage de la couche de polycyclodextrine (PCD).</i>	48
3.3.4.	Méthode de caractérisation physico-chimiques	48
3.3.4.1.	Quantification colorimétrique du revêtement PDA-PCD	48
3.3.4.1.1.	Quantification du PCD par le Toluidine Blue Ortho	49
3.3.4.1.2.	Quantification du PDA par l'Acide orange II (AO)	50
3.3.4.2.	Quantification des principes actifs (Paclitaxel et statine)	51
3.3.4.3.	Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)	52
3.3.4.4.	Analyses par Chromatographie par Perméation de Gel (GPC)	52
3.3.4.5.	Etudes de voltampérométrie cyclique	52
3.3.4.6.	Microscopie optique	52
3.3.4.7.	Microscopie électronique à balayage	52
3.3.4.8.	Ellipsométrie	53
3.3.5.	Evaluation biologique <i>in vitro</i>	53
3.3.5.1.	Viabilité cellulaire	53
3.3.5.2.	Vitalité et prolifération cellulaire	55
3.3.5.3.	Hémolyse	55
3.3.6.	Evaluation <i>in vivo</i> des stents fonctionnalisés	56
4.	Partie expérimentale	58
4.1.	Stents fonctionnalisés par immobilisation d'une molécule thérapeutique	58
4.1.1.	Principe général de la fonctionnalisation chimique de surface	58
4.1.1.1.	Greffage de polymères sur Titane	58
4.1.1.1.1.	Le titane et ses alliages	58
4.1.1.2.	Ancre chimique pour la fonctionnalisation du titane	61
4.1.1.3.	Greffage de brosse de polymère sur le titane	66
4.1.1.3.1.	Introduction	66
4.1.1.3.2.	Principe de la PRC	67

4.1.1.3.3.	Polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT	68
4.1.2.	Résultats et discussion.....	71
4.1.2.1.	Synthèse de l'agent de transfert dopamine-RAFT	71
4.1.2.2.	Synthèse des Polymères d'esters activés (pNAS) à partir de la dopamine-RAFT et du Benzyl-RAFT	72
4.1.2.3.	Post-fonctionnalisation des polymères de pNAS par la glucosamine.....	75
4.1.2.3.1.	Choix de la glucosamine.....	75
4.1.2.3.2.	Post-fonctionnalisation des polymères de NAS	77
4.1.2.4.	Greffages des polymères de glucosamine sur la surface du titane.....	80
4.1.2.4.1.	Oxydation des surfaces de titane	80
4.1.2.4.2.	Ancre biomimétique à base de dopamine.....	81
4.1.2.4.3.	Greffage des polymères de NAS sur le titane.....	81
4.1.2.5.	Etudes de cytocompatibilité des produits synthétisés et des surfaces de titane fonctionnalisées	83
4.1.2.5.1.	Cytocompatibilité du titane	83
4.1.2.5.2.	Etude de cytocompatibilité de l'ancre chimique dopamine-RAFT	85
4.1.2.5.3.	Etude de cytocompatibilité des polymères de glucosamine	87
4.1.2.5.4.	Cytocompatibilité des surfaces fonctionnalisées.....	89
4.1.3.	Discussion générale et conclusion.....	91
4.2.	Stent fonctionnalisé pour un système à libération prolongée de principe actif.....	93
4.2.1.	Principe général de fonctionnalisation pour la libération prolongée.....	93
4.2.1.1.	Généralités sur la polydopamine (PDA).....	93
4.2.1.2.	Généralités sur les cyclodextrines.....	95
4.2.1.3.	Généralités sur les alliages métalliques utilisés	99
4.2.1.3.1.	Le Titane et ses alliages.....	99
4.2.1.3.2.	L'alliage de cobalt (CoCr).....	100
4.2.2.	Résultats et discussion.....	101
4.2.2.1.	Optimisation du procédé de fonctionnalisation des pastilles de CoCr	101

4.2.2.1.1.	Optimisation des paramètres de greffage de la PDA.....	101
4.2.2.2.	Optimisation des paramètres de greffage du PCD.....	105
4.2.2.2.1.	Optimisation du temps et de la température de greffage.....	105
4.2.2.2.2.	Influence du rinçage sur le revêtement.....	111
4.2.2.2.3.	Conclusion.....	112
4.2.2.3.	Caractérisation des pastilles de CoCr-PDA-PM β CD.....	112
4.2.2.3.1.	Microscopie Electronique à Balayage.....	112
4.2.2.3.2.	Ellipsométrie.....	113
4.2.2.3.3.	Dégradation dans le milieu de culture.....	114
4.2.2.4.	Evaluations biologiques.....	115
4.2.2.4.1.	Viabilité cellulaire.....	115
4.2.2.4.2.	Vitalité et prolifération cellulaires.....	115
4.2.2.4.3.	Hémolyse.....	117
4.2.2.5.	Etudes des interactions entre le Principe Actif et le CoCr-PDA-PCD.....	117
4.2.2.5.1.	Etude avec le Paclitaxel.....	117
4.2.2.5.2.	Etude avec la simvastatine.....	120
4.2.2.6.	Implantation chez l'animal.....	123
4.3.	Discussion et conclusion.....	125
5.	Discussion générale - Perspectives.....	127
6.	Références bibliographiques.....	132
7.	Table des illustrations.....	155
8.	Annexes.....	162
9.	Résumé.....	177

1. INTRODUCTION GENERALE

Les maladies cardiovasculaires sont les premières causes de mortalité à travers le monde. L'athérosclérose en est l'étiologie la plus fréquente (1, 2).

Depuis le début des années 70, l'emploi de dispositifs médicaux implantables (DMI), tel que le stent, permet d'améliorer les résultats de la revascularisation endovasculaire comparé à une angioplastie simple (3, 4). La composante métallique des stents leur confère une résistance à la déformation qui s'oppose au recul élastique de la paroi artérielle pathologique siège d'une sténose. Les matériaux utilisés pour réaliser ces stents n'ont cessé de s'améliorer aussi bien en termes de performance technique qu'en termes de tolérance biologique. Néanmoins, certaines complications dans les suites de leur implantation sont encore trop souvent diagnostiquées ; la thrombose précoce et la resténose intra-stent. La réaction de la paroi artérielle à l'agression mécanique, et la médiocre tolérance de l'organisme à leur présence sur le long terme sont à l'origine de ces complications pouvant engager les pronostics fonctionnel et vital du patient.

L'arrivée en 2001 des stents actifs, stents métalliques enrobés d'une substance pharmaco-active, devait limiter ces complications. Les résultats à moyen termes de la 1^{ère} génération de stents actifs, couverts d'agents anti-prolifératifs, ont été décevants, avec notamment un taux de thrombose tardive élevé (5). De nombreuses méthodes de fonctionnalisation du revêtement métallique (6), ainsi que des nouveaux agents thérapeutiques sont en cours d'évaluation (7). C'est dans ce contexte que mon projet de thèse a été mené ; dans cette optique, nous voulions proposer une nouvelle plateforme métallique conservant les performances mécaniques de la dernière génération de stent associé à une amélioration de la biocompatibilité tout en présentant une molécule thérapeutique efficace dans la problématique de resténose/thrombose judicieusement choisie.

La conduite de ce projet a nécessité l'interaction de 3 équipes de recherche aux compétences spécifiques et complémentaires : l'équipe « Ingénierie des Systèmes Polymères » du CNRS (UMET, UMR 8207) pour ses compétences en chimie des polymères et en chimie de surface, le « Groupe de Recherche sur les Biomatériaux » de l'unité INSERM (U1008) pour ses compétences dans l'étude de l'interaction cellules –support et dans l'évaluation de l'activité biologique et thérapeutique des biomatériaux actifs et le Service de Chirurgie Vasculaire de l'hôpital cardiologique du CHRU de Lille pour son implication en recherche clinique.

La présentation de ce travail s'articule en 3 parties : une première qui propose un état de l'art incluant une étude bibliographique sur la pathologie athéroscléreuse, les techniques de

revascularisation et leurs complications. Un catalogue des pistes explorées actuellement pour ces complications est proposé.

Après un bref rappel sur les stratégies de fonctionnalisation chimique de surface existantes et après avoir présenté les différents outils à notre disposition pour parvenir à greffer des substances pharmacologiques à la surface des stents, la deuxième partie traitera de la synthèse et de l'immobilisation sur surface de titane de polymères bioactifs parfaitement définis. Ces derniers présentent en bout de chaîne une ancre chimique spécifique nécessaire au greffage et sur leur partie latérale des motifs bioactifs susceptibles d'être pertinents dans la problématique de resténose. L'illustration d'un tel modèle par immobilisation d'une molécule d'intérêt thérapeutique, la glucosamine, sera présentée. Les évaluations biologiques relatives à l'étude de cytocompatibilité des nouvelles « brosses » de polymères immobilisées sur titane seront ensuite détaillées.

La troisième partie concerne la mise au point et le greffage sur stent d'un système permettant la libération contrôlée d'une molécule d'intérêt thérapeutique (principalement la simvastatine). Ce système sera développé à partir d'un polymère à base de cyclodextrines qui sera greffé sur des stents en CoCr fonctionnalisés par la polydopamine, un polymère naturel hautement adhésif. Les résultats de la complexation de la matrice polymère immobilisée sur CoCr avec le Paclitaxel et la Simvastatine seront présentés. Enfin, la validation biologique *in vitro* et *in vivo* du système sera développée.

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. L'athérosclérose

L'athérosclérose a été décrite par l'OMS en 1958 comme étant « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et de moyens calibres, consistant en une accumulation focale de lipides, glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires, le tout s'accompagnant de modifications de la média »¹. Elle doit être distinguée de « l'artériosclérose » qui est une forme plus évoluée se traduisant par une sclérose des trois tuniques de la paroi artérielle. Elle représente la première étiologie des affections de la paroi artérielle dont l'expression clinique affecte des territoires tels que le cœur, le cerveau, et les jambes.

La pathologie cardiovasculaire représente dans nos sociétés développées la première cause de mortalité. En France, elle est responsable chaque année de 120 000 infarctus du myocarde, 130 000 accidents vasculaires cérébraux et 60 000 hospitalisations pour revascularisation des membres inférieurs avec environ 10 000 amputations majeures. L'athérosclérose est une maladie liée au vieillissement pour laquelle les facteurs de risques ont été clairement identifiés : il s'agit du tabagisme, de l'hypertension artérielle, des dyslipidémies, du diabète, de la surcharge pondérale, de l'âge et du sexe. L'athérosclérose est un problème majeur de santé publique, même si la mortalité cardiovasculaire qui lui est liée est actuellement en diminution. Cette diminution est rattachée à l'amélioration de l'encadrement thérapeutique depuis le milieu des années 1980.

Son développement se fait de façon lente et progressive, avec une première étape silencieuse. L'athérosclérose est assimilée à un processus dégénératif avec à terme le développement d'une plaque athéroscléreuse, caractérisée par l'accumulation au sein de la tunique interne (intima) de la paroi vasculaire (*Figure 1*) de protéines matricielles (collagène, élastine et protéoglycanes), de cellules musculaires lisses et de macrophages remplis de dépôts lipidiques (les cellules spumeuses) (*Figure 2a*). Le processus dans le détail est très complexe et n'est pas encore compris dans son intégralité (*Figure 2*).

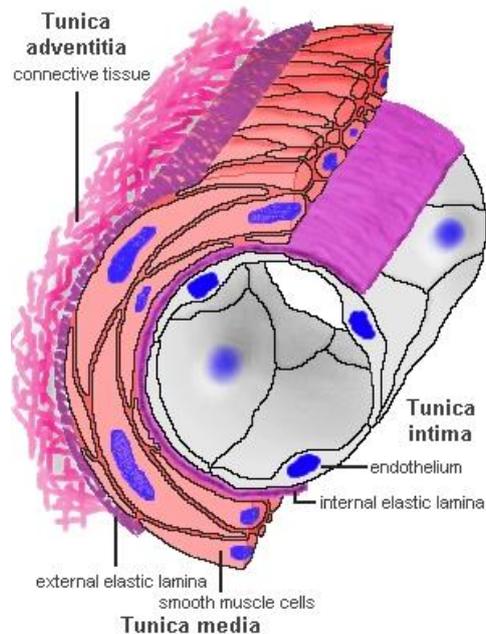


Figure 1 - Schéma de la constitution d'une paroi artérielle et de ses tuniques (d'après G Lefthériotis, CHU Angers, France)

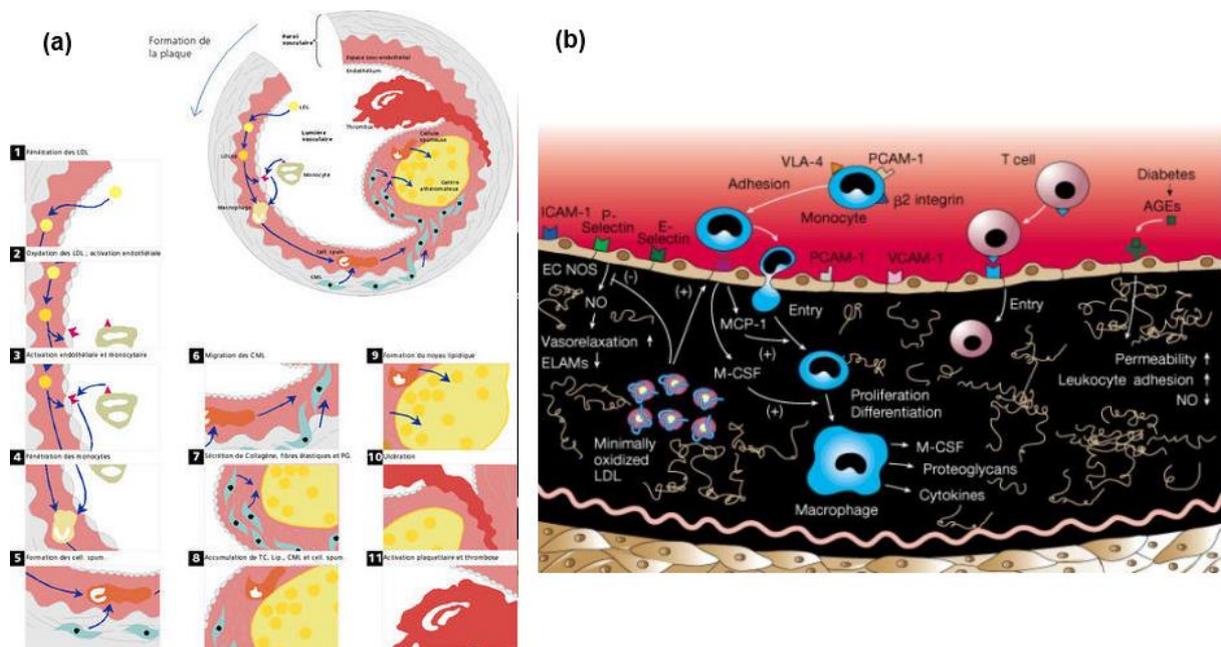
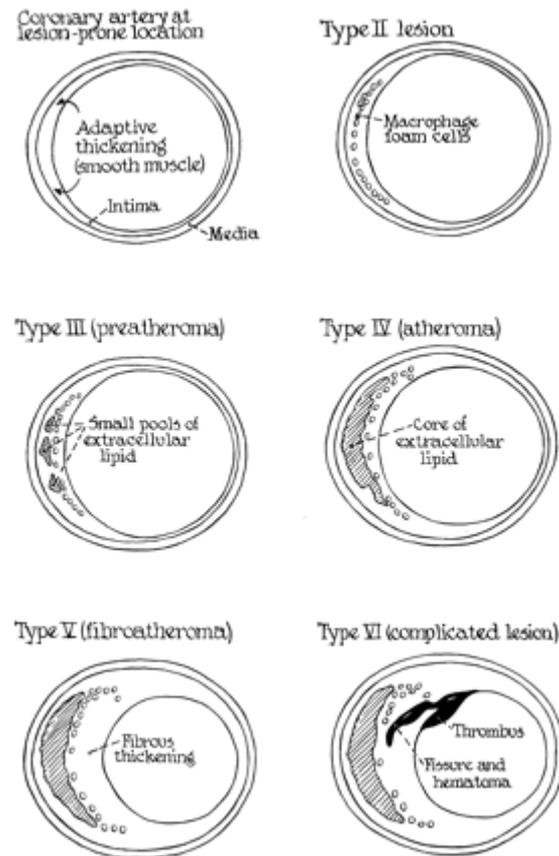


Figure 2 - (a) Schéma de l'athérogenèse (d'après H.C. STARY, 1994²) en 11 étapes depuis la constitution d'un amas lipidique à la surface de la paroi artérielle jusqu'à la rupture de la plaque athéroscléreuse ; (b) Signalisation de l'athérogenèse³

L'initiation des lésions athéroscléreuse dépend à la fois de la présence de lipoprotéines oxydées et de l'altération des fonctions de protection de la barrière endothéliale (dysfonction endothéliale).

Les lésions athéroscléreuses ont été classées en 6 stades par l'AHA (American Heart Association) (*Figure 3*)², j'emploie volontairement le mot « stade » plutôt que « type » car il s'agit d'une évolution linéaire et progressive où chaque étape est obligatoirement présentée.



*Figure 3 - Schéma de coupes transversales d'une artère inter-ventriculaire antérieure présentant des lésions intimales initiales de la maladie athéroscléreuse jusqu'au stade le plus évolué de la maladie*²

Stade 1 : lésions initiales, lésions microscopiques marquées par un infiltrat intimal de cellules spumeuses macrophagiques

Stade 2 : stries lipidiques, accumulation en amas des cellules spumeuses macrophagiques dans la couche sous-endothéliale de l'intima

Stade 3 : lésions intermédiaires, ou « pré-athéromateuses », elles sont irréversibles. Il s'agit de lésions intermédiaires entre le stade 2 et le stade 4

Stade 4 : lésions dites « athéromateuses », les vésicules lipidiques confluent pour former le core lipidique

Stade 5 : lésions dites « fibro-athéromateuses », marquées par la production d'une chape fibreuse intéressant l'intima, riches en fibres de collagène et en cellules musculaires lisses, elle-même riches en réticulum endoplasmique granuleux

Stade 6 : lésions dites « compliquées » se caractérisant par l'apparition de fissuration dans la couche endothéliale pouvant atteindre le centre nécrotique de la plaque, pouvant définir une véritable ulcération de la plaque.

Le retentissement hémodynamique et l'apparition de manifestations cliniques d'ischémie chronique apparaissent pour des plaques ayant rétrécies de plus de 50% le diamètre de la lumière artérielle (on parle de sténose significative, *Figure 4*). Par ailleurs, des manifestations aiguës peuvent survenir ; elles sont d'ailleurs majoritairement responsables des décès, dans le cas des artères coronaires. Dans ce cas précis, il s'agit d'accident thrombotique impliquant un phénomène mécanique ayant pour origine la rupture ou l'érosion de la plaque athéroscléreuse. La rupture de la chape fibreuse de la plaque met le sang en contact avec des éléments thrombogènes du centre lipidique, aboutissant à une activation plaquettaire majeure et déclenchant ensuite la cascade de coagulation à l'origine de l'accident thrombotique, qui met en péril l'organe situé en aval.

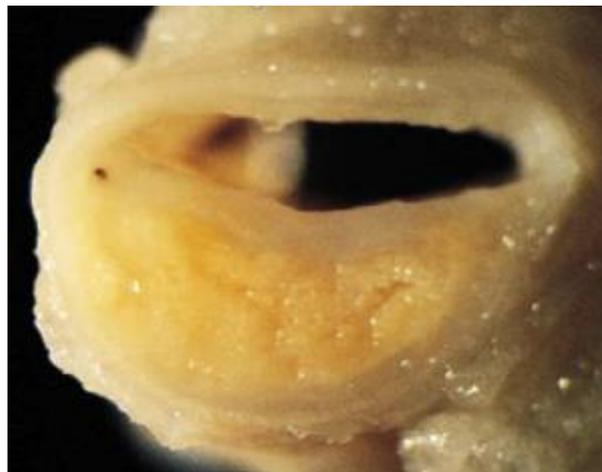


Figure 4 - Vue macroscopique en coupe transversale d'une artère coronaire présentant une sténose athéromateuse sévère (source inconnue)

La prise en charge de ces malades doit être globale. Elle a pour but de limiter les complications cardiovasculaires liées à cette pathologie occlusive. En dehors de tout contexte d'urgence, dans un premier temps, il s'agit du contrôle des facteurs de risques cardiovasculaires modifiables ⁴⁻⁸ auxquels s'associent 3 classes médicamenteuses thérapeutiques administrées par voie systémique quotidienne: les antiagrégants plaquettaires (AAP), les statines et les inhibiteurs de l'enzyme de conversion (ou antagonistes des récepteurs à l'angiotensine 2), qui ont fait preuve de leur efficacité en prévention primaire et secondaire réduisant significativement le risque de survenue d'infarctus du myocarde et d'accidents vasculaires cérébraux chez ces patients ⁹⁻¹¹.

De plus, en cas de sténoses significatives symptomatiques, un traitement invasif spécifique de revascularisation peut être proposé au patient.

2.2. Revascularisations artérielles

2.2.1. Pontages et Thrombo-endarterectomies (TEA) artériels et leurs complications

Avant le développement des techniques endovasculaires, le traitement chirurgical de revascularisation de référence était le pontage, en cas de lésions longues et/ou d'artères de petits calibres, ou la thrombo-endarterectomie, pour les lésions courtes sur des artères de moyens à gros calibres. La technique de thrombo-endarterectomie a été décrite par Ci Dos Santos en 1947. Cette technique chirurgicale consiste à cliver l'endartère aux dépens de laquelle s'est développée la plaque d'athérome¹². La mise à nu de la couche sous-endothéliale thrombogène contre-indique l'application de ce geste à des artères d'un diamètre inférieur à 4 mm, ceci afin d'éviter les thromboses précoces. Lorsque l'artère revascularisée présente un diamètre inférieur, on peut compléter le geste par l'interposition d'un patch d'élargissement ; ce patch sera préférentiellement constitué de matériel autologue (veine saphène interne) ou de matériel prothétique (polyéthylène téréphtalate (PET) ou polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE)). Ses indications restent limitées ; les localisations privilégiées sont le bulbe carotidien, le trépied fémoral et l'aorte viscérale (*Figure 5*)¹³.

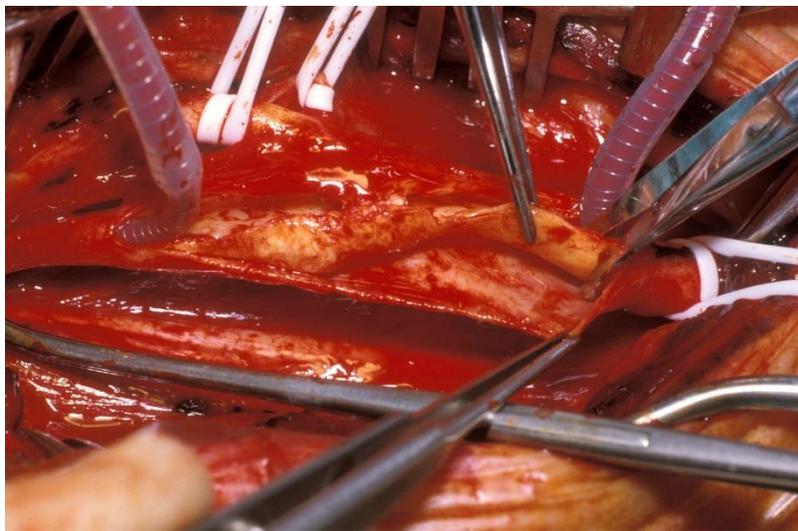


Figure 5 - Vue peropératoire d'une TEA du bulbe carotidien. On voit parfaitement le plan de clivage emportant la plaque d'athérome développée aux dépens de l'intima

Les pontages restent le traitement de choix en cas de lésions artérielles longues ; les substituts vasculaires utilisés pour leur exécution s'est élargie dans les années 50, avec d'une part l'expérience d'Oudot sur le PET¹⁴ et d'autre part les travaux de De Bakey sur le ePTFE¹⁵. Si

le greffon veineux reste un « gold standard » dans la revascularisation sous-inguinale ¹⁶, le matériel prothétique est utilisé, hors contexte septique, en première intention pour toutes reconstructions aorto-iliaques ^{17,18}.

Les suites d'une revascularisation chirurgicale à ciel ouvert, que ce soit après TEA ou pontage, comportent les mêmes complications, avec des incidences qui varient selon la localisation du geste. Ainsi, après une période péri-opératoire où le risque majeur est l'hémorragie et/ou l'occlusion, le patient est également exposé à des retards de cicatrisation sur la voie d'abord pouvant parfois être à l'origine, par contiguïté d'infection du matériel implanté, surtout quand il s'agit de matériel prothétique ¹⁹. A moyen et long termes, la localisation du pontage effectué et le type de greffon utilisé pour la reconstruction artérielle, sont des facteurs déterminant de la perméabilité du geste de revascularisation ²⁰.

L'ensemble des auteurs s'accordent à dire que ces techniques chirurgicales à ciel ouvert sont applicables à des patients ayant un état général compatible avec une intervention chirurgicale ²¹. Pour élargir les indications de revascularisation, des techniques moins invasives ont été développées dès la fin des années 60 ²².

2.2.2. Principe de l'angioplastie artérielle

Dès 1968, Dotter et al. proposent comme alternative à la chirurgie à ciel ouvert une technique endoluminale ayant pour principe d'ouvrir mécaniquement à l'aide d'une sonde pleine à ballonnet la lumière de l'artère sténosée. L'hypothèse initiale reposait sur une compaction de la plaque d'athérome par éclatement (*Figure 6*) ²².

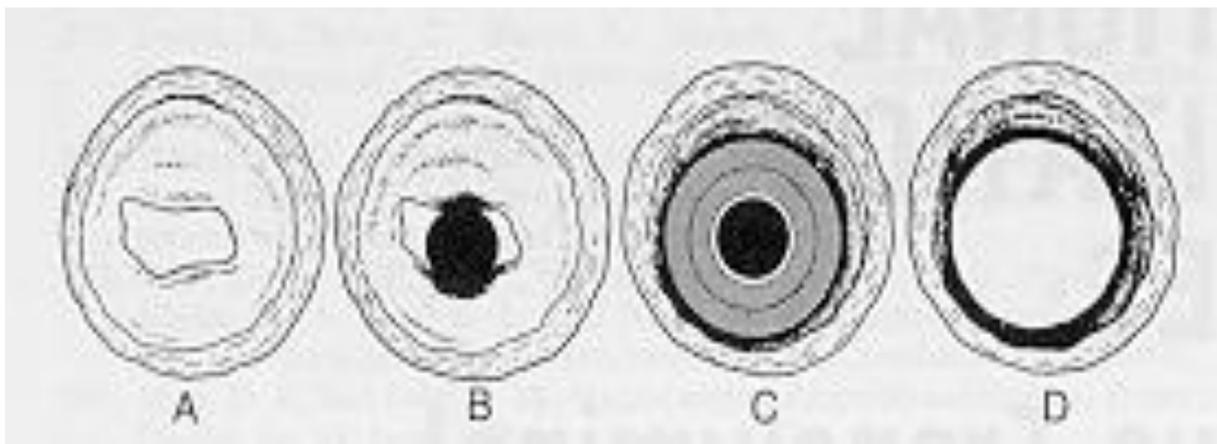


Figure 6 - Effet de la dilatation au ballon plein selon Dotter ²²

L'utilisation de l'angioplastie concernait des lésions coronaires simples (peu calcifiées) chez des patients dans des situations cliniques stables. Initialement, les résultats de l'angioplastie étaient peu satisfaisants avec un taux élevé de complications per opératoires liées

essentiellement aux dissections occlusives résiduelles. La technique a rapidement évolué et dès 1979, Gruntzig a proposé un ballon de dilatation rempli au sérum physiologique, sous la forme encore utilisée aujourd'hui²³. L'expérience initiale des angioplasties ilio-fémoro-poplitées rapportait un taux de succès supérieur à 90% avec des résultats maintenus entre 3 et 10 mois après le geste initial²⁴.

Il a été démontré que l'angioplastie au ballon induit à la fois un écrasement de la plaque d'athérome par la pression exercée par le ballonnet, un refoulement de la plaque et un étirement de la paroi artérielle (une artère est dite COMPLIANTE, élastique et peut être élargie entre 10 et 15 % par rapport à sa taille initiale) (Figure 7)²⁵.

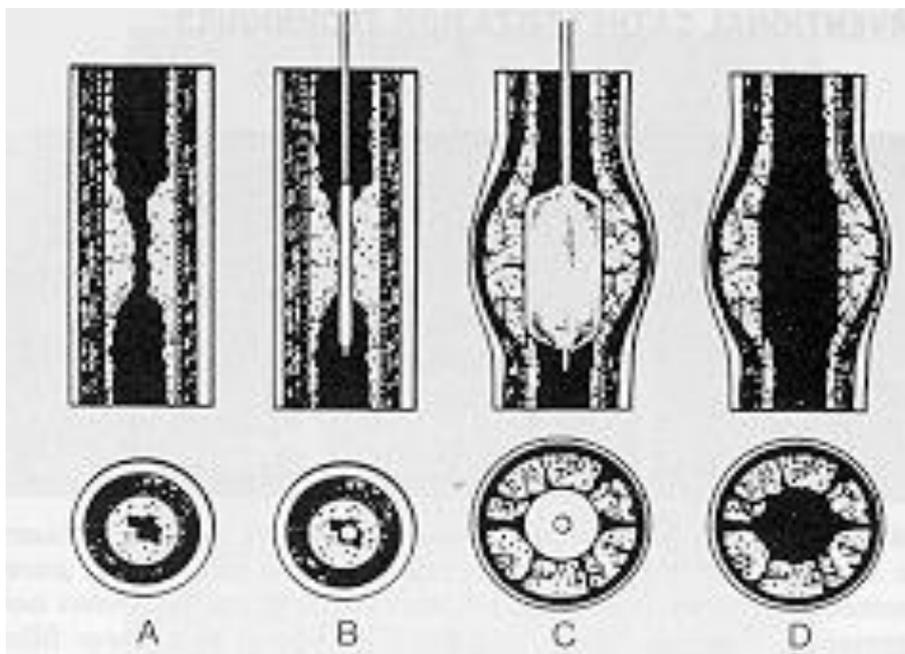


Figure 7 - effet de la dilatation à l'aide d'une sonde à ballonnet utilisé par Gruntzig sur la paroi artérielle selon Castaneda-Zuniga ; (a) : plaque athéroscléreuse sténosante, (b) : le ballon dégonflé est positionné en regard de la zone à traiter, (c) : écrasement-refoulement-étirement de la plaque d'athérome et de la paroi artérielle, (d) : l'effet appliqué est maintenu après retrait du ballon

Malgré des taux de succès techniques initiaux intéressants après angioplastie au ballon, l'enthousiasme général est un peu retombé en raison des taux élevés de thrombose aiguë et de resténose au-delà de 6 mois²⁶. Une innovation technologique était nécessaire pour améliorer ces résultats.

2.3. Le Stent

2.3.1. Historique et généralités

Un support endoluminale après angioplastie a été décrit dès 1969 par Dotter lui-même ²⁷. Néanmoins, sans doute en raison des résultats initiaux encourageants de l'angioplastie simple, ce n'est que 14 ans plus tard, que la nécessité d'implanter un support mécanique endoluminale en complément a été évaluée ²⁸⁻³³. Le stent doit fournir un support en s'exposant au recul élastique de la paroi artérielle (« elastic recoil ») et orienter la cicatrisation en cas de dissection focale traumatique post-dilatation pouvant entraver le passage du flux artériel.

Les premiers modèles implantés chez l'homme étaient initialement constitués d'acier ou de NiTiNOL auto-expansibles. Palmaz a de son côté développé un modèle de stent en acier expansible sur ballonnet ³⁴, offrant une force radiale bien supérieure pour ouvrir les lésions très calcifiées. Rousseau à Toulouse a développé un stent auto-expansible couvert de tissu étanche, et publié une série d'expérimentation animale concluante ³⁵.

Il y a donc dès la fin des années 80, 3 catégories de stent qui se sont développées quasiment de façon simultanée :

- les stents auto-expansibles en NiTiNOL ou en acier,
- les stents expansibles sur ballonnets en acier proposés par Palmaz et
- les stents couverts de tissu, appelés endoprothèses, initialement composés d'acier.

A l'issue de ces publications, le développement de ces nouveaux dispositifs s'est accéléré avec comme objectif l'amélioration des résultats cliniques. En 1999, un stent était implanté dans plus de 84% des procédures coronaires ³⁶.

Le stent a été classé par les autorités européennes dans la catégorie 3 des dispositifs médicaux implantables ; représentant la catégorie la plus à risque de complications locales et générales après implantation ³⁷.

2.3.2. Fabrication du stent / les matériaux utilisés

Cahier des charges - Les performances d'un stent intègrent le cadre des exigences d'un biomatériau cardiovasculaire avec des propriétés biomécaniques, de biocompatibilité, et de thromborésistance.

Ces 3 éléments relevés par Palmaz restent évidemment d'actualité ³⁸. Concernant la partie biomécanique, il s'agit de la résistance à la compression et à la déformation (fracture) et de la force radiale. Pour le volet biocompatibilité, comme tout biomatériau, il doit se conformer aux normes ISO-10993 et doit notamment faire preuve d'une excellente résistance à la corrosion

³⁹. Particularité des dispositifs médicaux du domaine cardiovasculaire, sa thromborésistance sera également évaluée selon les normes ISO 10993-4 ⁴⁰ ; une étude précise des interactions entre la surface métallique et les éléments figurés du sang sera réalisée ^{41, 42}. La compatibilité IRM du stent ainsi que la fiabilité et la sécurité du système de déploiement seront également évaluées ⁴³.

La conformation de l'ensemble du dispositif à ce cahier des charges doit permettre de minimiser les complications rencontrées lors de l'utilisation du dispositif en pratique clinique.

2.3.3. Fabrication d'un stent

Il est encore à l'heure actuelle très difficile d'obtenir des informations précises sur les méthodes de fabrication des stents. Le choix du matériau et la forme que l'on va souhaiter lui imprimer sont essentiels.

La méthode de fabrication d'un stent par simple enroulement d'un fil et de points jonction réalisés par simple soudure est remplacée actuellement par le découpage laser d'un tube métallique plein. Ce procédé augmente le rendement et surtout la précision et la netteté de la finition dans la découpe des matériaux.

On distingue les stents dits à cellules « ouvertes » (Everflex Protégé, Covidien) et à cellules « fermées » (WallStent, Boston Scientific, Natick, MA., USA) (*Figure 8*). Les stents à cellules « ouvertes » ont une aire de surface entre les mailles qui augmentent avec l'expansion de la maille, alors que cette aire reste théoriquement inchangée pour les stents à cellules « fermées ». Certains auteurs incluent dans cette définition la densité de surface de métal appliqué contre la paroi artérielle. Une aire d'ouverture entre les mailles supérieure à 5 mm² permet arbitrairement de classer un stent dans l'une ou l'autre catégorie (ouvertes ≥ 5 mm² et fermées < 5 mm²) ⁴⁴.

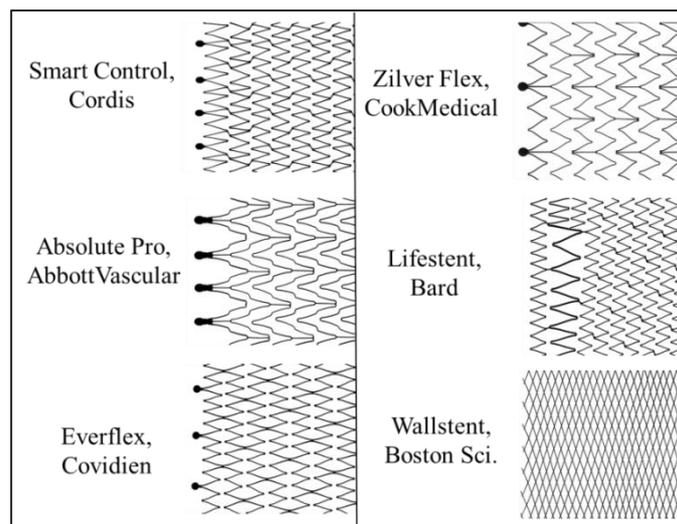


Figure 8 - Schématisation des maillages des différents stents auto-expansibles sur le marché (d'après AbbottVascular R&D department)

La trame du maillage a une épaisseur différente d'un stent à l'autre, avec des formes différentes ; d'un fabricant à l'autre les stents sont très différents (Figure 8).

Le choix de l'architecture des stents implantés chez l'animal puis chez l'homme, a montré une influence directe sur les résultats hémodynamiques⁴⁵ et cliniques⁴⁶⁻⁴⁸ ; leur forme va ainsi influencer sur leur capacité à se conformer aux irrégularités de la paroi, sur leur résistance à la fatigue (fracture)⁴⁹, et permettre d'homogénéiser la force exercée sur la paroi⁵⁰. L'ensemble de ces éléments devant tendre à limiter l'irritation chronique du biomatériau sur la paroi artérielle, génératrice d'une réponse cellulaire et directement impliquée dans les phénomènes de resténose et de thrombose intra-stent ; ceci est valable également pour les dispositifs de dernière génération⁵¹⁻⁵⁴.

Le nature du composant métallique du stent a également une influence directe sur les performances du stent^{55,56}.

2.3.4. Le Titane et ses alliages

2.3.4.1. Le titane

Le titane est le 22^{ème} élément de la classification périodique de Mendeleïev. Il est le 9^{ème} élément le plus abondant de la planète^{57, 58}. Découvert en 1794, il n'a été obtenu à haute pureté qu'à partir de 1910. Ses premières productions industrielles ne débutent qu'en 1945⁵⁹. Ce métal de transition de couleur blanc argent est connu pour sa solidité et sa légèreté. Avec une masse volumique de $4,5 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ⁶⁰, il est environ 40% moins lourd que les aciers courants. Ses caractéristiques mécaniques sont proches de celles de l'acier tout en possédant une

meilleure résistance à la corrosion. Cette dernière caractéristique, il la doit à la formation d'une couche d'oxyde de titane qui passive la surface dès qu'il est au contact de l'air ou de l'eau. Il possède 2 autres avantages notables : il est non-magnétique (compatible avec les acquisitions d'imagerie par résonance magnétique ⁶¹) et surtout biocompatible. C'est pourquoi aujourd'hui le titane est un composant très utilisé dans de nombreux domaines ⁶²⁻⁶⁴ parmi lesquels les biomatériaux ⁶⁵.

2.3.4.2. Les alliages de titane, le NiTiNOL

Le titane est un métal de transition, avec en cristallographie une forme α à basse température et une forme β à haute température, pour une température de transition allotropique à pression atmosphérique de 882°C ⁶⁶. Il peut, par cette caractéristique, former des solutions solides avec un grand nombre d'éléments d'addition. Ces éléments permettent de modifier les propriétés du titane pour l'adapter au mieux à ses applications. Dans le domaine médical, par exemple, le titane est employé sous quatre formes :

- Le titane pur (phase α) qui présente une trop faible résistance mécanique.
- Les alliages de type ($\alpha + \beta$). Ces alliages dits « duals », confèrent une grande résistance à la corrosion et un module d'élasticité élevé. L'alliage le plus employé dans le domaine médical est le Ti-6Al-4V ⁶⁷.
- Les alliages à base de titane β métastable. Leur biocompatibilité est supérieure aux autres alliages de titane et surtout ils présentent un module d'élasticité proche de celui de l'os ⁶⁸.
- Le NiTiNOL (pour Nickel Titanium Naval Ordnance Laboratory) est composé d'un mélange équimolaire de titane et de nickel. Il se comporte à la fois comme un matériau à mémoire de forme et comme un alliage super-élastique. Cette dernière caractéristique lui permet d'avoir une excellente résistance à la fatigue ainsi qu'une grande déformabilité, ce qui en fait le matériau de choix pour la fabrication de stents auto-expansibles ⁶⁹. Il ne peut pas par contre maintenir ouvertes des lésions très calcifiées, car son module d'élasticité est très bas (100 GPa).

2.3.5. Alliages de Cobalt-Chrome

Les alliages de Cobalt-Chrome sont largement utilisés dans le domaine biomédical. Leur utilisation est répandue et décrite depuis le début des années 40 pour des applications buccodentaires puis orthopédiques ⁷⁰. La première application de ces alliages dans la

constitution des stents est réalisée en 1970. En termes de performance mécanique, ils sont supérieurs aux performances des aciers pour une section inférieure. Les éléments rentrant dans leur constitution sont connus dans les grandes lignes, mais la composition précise reste encore parfois imparfaitement définie. Ces variations de compositions influenceront directement leurs propriétés mécaniques, telles la dureté, la ductilité, leur résistance à la corrosion, etc. ainsi que leur comportement thermique, la coulabilité et surtout leur biocompatibilité.

Le Cobalt est majoritairement représenté dans ces alliages (excepté pour le Ticonium) ; c'est un métal de transition et il est le 27^{ème} élément de la classification de Mendeleïev. Sa masse volumique est 2 fois plus élevée que le titane puisqu'elle atteint $8,9\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ⁷¹. Il fut utilisé comme élément d'addition pour la 1^{ère} fois en 1910 dans l'acier. L'ensemble de ses alliages présente une excellente résistance à la corrosion⁷². On peut classiquement évoquer 4 types d'alliages complexes à base de Cobalt :

- les superalliages, utilisés dans l'aéronautique
- les alliages à propriétés magnétiques spéciales,
- les alliages résistants à l'abrasion
- les alliages appliqués au biomédical

Parmi ces derniers, retenons le Vitalium, le Wisil et le L605 qui présentent une résistance à la corrosion exceptionnelle en milieu biologique⁷³. Celle-ci est supérieure à celle de l'acier et inférieure à celle du titane. En plus d'une constitution, comme son nom l'indique, à base de Cobalt et de Chrome, on y retrouve dans des proportions variables essentiellement du Tungstène (pour le L605) et du Molybdène (pour le Vitalium et le Wisil). Ces capacités de résistance à la déformation et à l'élongation sont fonction de la nature des adjuvants et des proportions de chacun des constituants ; par exemple : le Co-Cr-Mo (répondant à la norme américaine ASTM F75) présente une capacité d'élongation de 8%, quand le Co-Ni-Cr-Mo (ASTM F562) a une capacité d'élongation de 50%.

Son module d'élasticité compris entre 330 et 350·GPa est supérieur à celui de l'acier 316L (200 GPa). Il a une densité supérieur à l'acier, ce qui le rend plus radio-opaque à section équivalente. Il est non-magnétique, ce qui interfère peu les acquisitions d'imageries de type scanner et est compatible avec une acquisition IRM⁷⁴. Son utilisation pour le domaine cardiovasculaire a significativement augmenté ces 10 dernières années⁷⁵. Il est utilisé pour des stents sertis sur ballon ; mais ses caractéristiques pourraient également le rendre utilisable

en version auto-expansible. Il apparaît en tout point supérieur dans ses performances à l'acier 316L⁷⁶.

2.3.6. Acier 316LM

Jusqu'à la fin des années 90, les stents en acier représentaient encore plus de 50% des stents implantés en coronaire⁷⁷. L'acier utilisé pour la fabrication des stents répond à la norme américaine 316L ou X2CrNiMo18-9 en Europe). C'est un acier fortement allié essentiellement composé de Fer, Chrome, Nickel et de Molybdène. Il possède des qualités remarquables en termes de résistance mécanique et de biocompatibilité ; néanmoins, son caractère ferromagnétique le rend non compatible avec une acquisition IRM et son module d'élasticité intermédiaire, n'en font plus le matériau de choix.

2.4. Problématique liées à l'angioplastie et au stenting

2.4.1. Thrombose précoce

La thrombose précoce est un phénomène aigu ou subaigu survenant rapidement (dans les 24 premières heures en général) après le geste de dilatation et/ou de stenting⁷⁸. Elle est favorisée par la désendothélialisation de la paroi vasculaire liée au traumatisme mécanique de la dilatation ; elle reprend la physiopathologie de la rupture spontanée de la plaque avec mise en contact des éléments thrombogènes situés dans le core lipidique, elle est ainsi suivie d'une adhésion et d'une agrégation plaquettaire endoluminale. Elle peut être à l'origine d'une ischémie aiguë des territoires d'aval. Sa fréquence a nettement diminué ces dernières années, et se situe entre 2 et 3%^{79, 80}, grâce à une meilleure gestion du traitement médical^{81, 82}. Elle semble toutefois plus fréquente lors de l'implantation de stents comparativement à l'angioplastie simple 3,9% vs 0,6% respectivement⁸³.

2.4.2. Re-sténose

Contrairement à la thrombose qui est un phénomène de survenue brutale dans la période péri-opératoire, la resténose est un phénomène d'apparition plus progressive. Elle débute dès l'agression mécanique de la paroi artérielle et se prolonge pendant plusieurs semaines^{84, 85}. Après dilatation au ballon, elle touche jusqu'à 40% des patients à 6 mois^{86, 87}. Dans le cas de la dilatation, le principal mécanisme de la resténose semble être le phénomène de recul élastique de la paroi artérielle⁸⁸, même si une activation cellulaire intense est également décrite⁸⁹. Après dilatation et implantation d'un stent, le mécanisme de la resténose est double associant un remodelage artériel constrictif et une réaction cicatricielle excessive de la paroi

artérielle par hyperplasie néo-intimale^{84, 85}. Son taux est de 30% en position coronaire et est souvent plus élevé dans les axes périphériques⁹⁰⁻⁹³.

L'implantation d'un stent a permis de répondre et de limiter mécaniquement l'effet du remodelage constrictif, mais aucune solution efficace dans le temps n'a permis de régler le problème de l'hyperplasie néointimale (*Figure 9*).



Figure 9 - Resténose intra-stent ; hyperplasie néointimale associé à un remodelage constrictif vont occlure progressivement la lumière artérielle (d'après Serruys PW)

Le mécanisme d'hyperplasie néointimale est complexe et reste mal maîtrisé, 2 phases sont habituellement décrites :

Une phase précoce, immédiate faisant intervenir des éléments circulants du sang avec activation majeure d'une cascade inflammatoire⁹⁴. Une phase tardive mettant en jeu les éléments des couches profondes de la paroi artérielle avec activation, prolifération et migration notamment des cellules musculaires lisses et production de matrice extracellulaire⁹⁵.

Des centaines d'équipes de recherche dans le monde s'activent quotidiennement pour comprendre parfaitement ce phénomène. Dans le paragraphe suivant, nous ferons un catalogue des dispositifs existant pour limiter ce phénomène ; nous évoquerons aussi les principales pistes de recherche développées actuellement.

2.5. Inventaire des systèmes expérimentés pour améliorer les résultats cliniques après implantation de stent

2.5.1. Généralités et historique

La resténose est apparue rapidement comme un phénomène défavorable dans les suites du stenting responsable de réinterventions secondaires chez plus de 10 à 15% des patients à 1 an^{96, 97}. Pour améliorer ces résultats, l'administration (systémique) de molécules thérapeutiques, bien connues dans la prévention primaire et secondaire cardiovasculaire, a été proposé :

- les héparines⁹⁸, et autres anticoagulants oraux⁹⁹,
- les anti-GP2b3a¹⁰⁰, et les nouveaux antiagrégants plaquettaires^{101, 102},
- les statines¹⁰³,
- les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine 2¹⁰⁴,
- ainsi que d'autres classes pharmaceutiques ont démontré leur intérêt : le cilostazol^{105, 106}, les anti-inflammatoires¹⁰⁷, certains agents antiprolifératifs^{108, 109}, des agents anti-oxidants¹¹⁰] ou encore des dérivés de statines, tels l'AGI-1067 (dérivé du probucol)¹¹¹.

L'efficacité des statines et apparentés qui sont des anti-oxidants, repose sur le rôle prépondérant des progéniteurs endothéliaux circulants (EPC) dans la cicatrisation de la paroi artérielle après traumatisme¹¹²⁻¹¹⁴. Sous cette appellation, sont classiquement incluses les lignées cellulaires CD34+ et CD133 dérivant des cellules souches hématopoïétiques^{115, 116}.

Pour limiter la resténose, il est aussi proposé de modifier la surface du stent interagissant avec la paroi artérielle. Nous avons vu déjà que le type de métal utilisé, la forme et l'épaisseur du stent influencent la réponse cellulaire à son contact. Si sur le fond, l'influence de ces caractéristiques sur la resténose semblent évident, leurs résultats n'ont été démontrés en pratique clinique que récemment.

À la fin des années 90, il a été proposé d'implanter des stents recouverts par une membrane de PTFE¹¹⁷. Si la prolifération néo-intimale ne s'engageait pas dans les mailles du stent protégées de PTFE, le problème persistait à l'entrée et à la sortie du stent. L'utilisation de ces dispositifs est actuellement réservée aux ruptures, aux anévrismes et aux fistules coronaires^{51, 118, 119}. Pour les artères périphériques, ils semblent exister un bénéfice en termes de perméabilité primaire (73% à 1an)¹²⁰.

Devant ces résultats mitigés, l'idée a été de produire un stent qui agirait comme un médicament directement au cœur de l'artère à revasculariser ; plusieurs modèles ont ainsi été proposés :

2.5.2. Brachythérapie endovasculaire / Stents Radioactifs

La brachythérapie endoluminale est une application rapportée de thérapie anticancéreuse pour les voies digestives et broncho-pulmonaires pour la première fois publiée en 1987¹²¹. Sa première application cardiovasculaire a été décrite par Böttcher HD en 1994¹²². Le principe repose sur l'enduction d'un ballon ou d'un stent par une substance émettant des rayonnements gamma ou béta à dose contrôlée qui agiront sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la resténose¹²³. Dès 1995, Waksman R *et al.* ont publié la faisabilité et surtout le bénéfice de la brachythérapie endovasculaire sur la resténose dans un modèle de mini-porc¹²⁴. L'application de ce dispositif et les premières séries publiées chez l'homme ont rapidement montré des résultats encourageants¹²⁵.

La brachythérapie, initialement réalisée avec du Phosphore 32 puis de l'Iridium 192, est en train d'évoluer avec l'utilisation de Rhénium 188¹²⁶⁻¹²⁸. D'autres radio-isotopes ont également été proposés comme le Strontium 90 /Yttrium 90 ainsi que le Holmium 166¹²⁹⁻¹³¹. Cependant, d'importants problèmes concernant la manipulation et la conservation des dispositifs ne permettent pas à l'heure actuelle une généralisation de leur utilisation en pratique clinique courante¹³². De plus, la variabilité des pratiques en termes de dose, de longueurs de zones à traiter (concept du « cold-end » stent et « hot-end » stent) et de durée d'exposition aux rayonnements de la lésion artérielle est importante^{133, 134}. Enfin, les 2 principaux problèmes liés à ces dispositifs sont représentés par un taux de thrombose tardive important (5 et 15%), ainsi que par un taux de resténose important aux extrémités du stent (« candy wrapper »)^{135, 136}. Devant les contraintes et les résultats décevants, cette approche reste très confidentielle à l'heure actuelle.

2.5.3. Stents barrières

Les stents dits « barrières » sont des stents recouverts d'une surface « inerte » ayant pour but d'améliorer leur performance en rapport avec leur cytocompatibilité et d'améliorer leur thromborésistance ; plusieurs revêtements ont ainsi été proposés à base de métaux (Titanium-Nitride oxide)¹³⁷, de protéines¹³⁸, de phosphorylcholine¹³⁹, et de polymère inerte hydrophobe⁵³. Aucun résultat clinique n'a pu démontrer leur supériorité sur les stents nus, excepté peut-être pour le premier cité, le stent revêtu de Titane et d'oxyde nitrique commercialisé par Hexacath (Rueil-Malmaison, France) qui dans une étude prospective randomisée avait des résultats supérieurs au stent nu¹⁴⁰.

2.5.4. Stents à élution de médicaments

Le premier stent « actif » a été un stent enrobé d'un polymère et libérant héparine. Dans l'étude BENESTENT 2 d'excellents résultats précoces sur la resténose ont été rapportés avec ces stents ¹⁴¹. Depuis, de nombreux modèles ont été décrits.

2.5.4.1. Modèles possibles

Le catalogue des stents à libération de médicaments est vaste (*Figure 10*).

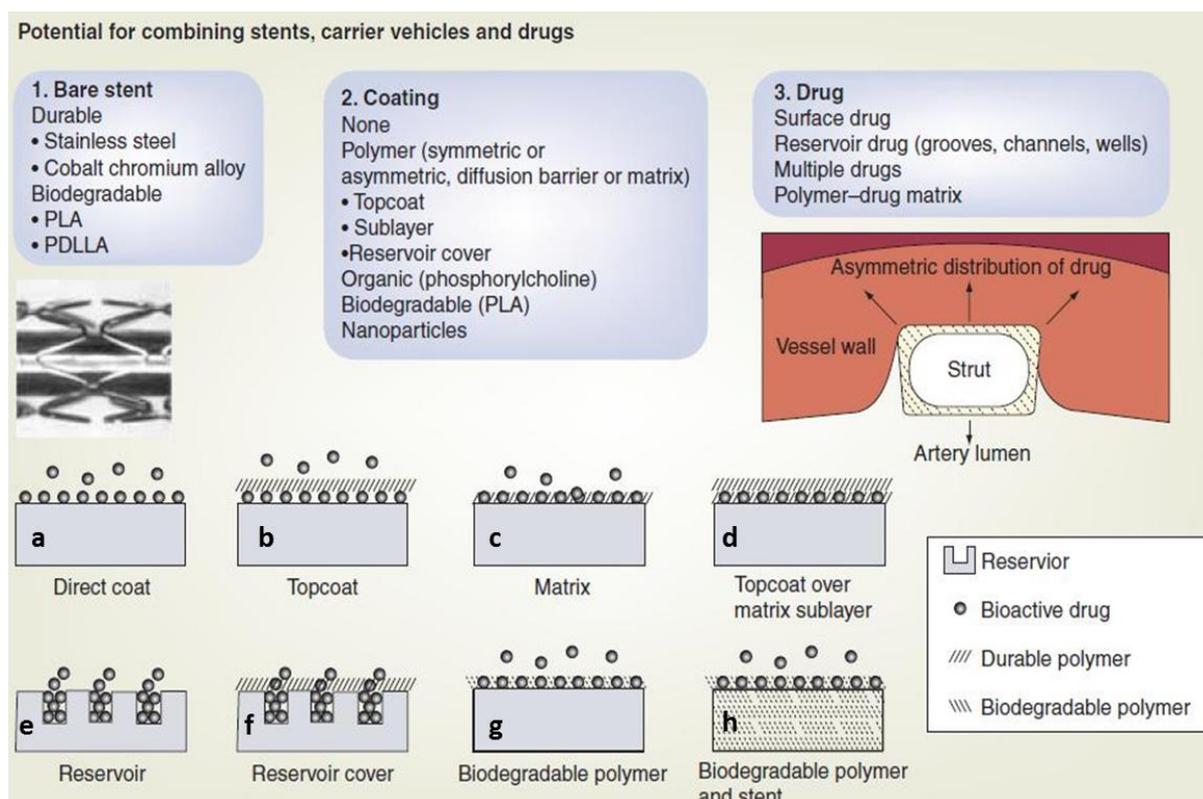


Figure 10 - Modèles existants de stents « actifs » à libération de médicaments (d'après Grube E, 2006 ¹⁴²)

On présente d'abord l'interface permettant la libération contrôlée dans le temps de la molécule thérapeutique et ensuite les différentes molécules thérapeutiques utilisées.

Le premier modèle (*Figure 10a*) est celui de l'adsorption directe de la molécule thérapeutique sur le revêtement métallique ; il peut être assimilé aux stents dits « barrières », où seules les propriétés physico-chimiques de la molécule thérapeutique interviendront dans son mode de libération ou de dégradation. Ces stents sont appelés « polymer-free » ; Dake M a décrit l'utilisation de ce stent dans la revascularisation de l'axe fémoro-poplité ¹⁴³. Toute la particularité de ce stent repose sur le caractère extrêmement lipophile du Paclitaxel qui le recouvre. Je reviendrai plus en détail sur cette molécule dans le chapitre 2.

Le second modèle (*Figure 10b*) d'interface est un stent dont la molécule thérapeutique est adsorbée sur la surface métallique avec une couche supérieure de polymère non résorbable jouant un effet de barrière. Ce modèle n'est pas utilisé sur le marché actuellement.

Le troisième modèle (*Figure 10c*) est un stent métallique recouvert d'une matrice polymère non résorbable dans laquelle est piégée la molécule thérapeutique. Le stent commercialisé sous cette forme est le Taxus (Boston Scientific, Natick, MA, USA).

Le quatrième modèle (*Figure 10d*) est un stent métallique recouvert d'une matrice polymère non résorbable dans laquelle est piégée la molécule thérapeutique ; un enrobage supplémentaire par un polymère non résorbable est appliqué pour ralentir la libération de la molécule thérapeutique. Le stent commercialisé sous cette forme est le Cypher (Cordis, Johnson & Johnson, Warren, NJ, USA). Face à des défauts de fabrication récurrents et à un volume de vente jugé trop faible pour une exploitation rentable, la production de ce stent a été interrompue [REUTERS 2011-06-15].

Les cinquième (*Figure 10e*) et sixième (*Figure 10f*) modèles sont les modèles de stents dit « à réservoir ». Il s'agit de stents où le surfaçage a été retravaillé permettant la création de « pores » au sein de la surface métallique offrant la possibilité d'un stockage de molécules thérapeutiques. Ces modèles de stents sont représentés actuellement par le stent Cre8 (CID, Saluggia, Italy) ¹⁴⁴. Le CoCr est enduit d'une fine couche de carbone (i-Carbofilm, CID, Saluggia, Italy) qui adsorbe en surface du Sirolimus (0,9µg/mm²) couplé à un acide organique. Il est dit sans interface polymère.

Le modèle de la *Figure 10g* correspond à un stent où l'utilisation d'une couche de polymère biorésorbable qui ralentira la libération de la molécule thérapeutique (exemple de stent au PLGA en cours d'évaluation ¹⁴⁵)

Enfin le dernier modèle (*Figure 10h*) est actuellement en cours d'évaluation ; il s'agit du stent ADSORB (AbbottVascular, Santa Clara, CA, USA). Il est constitué d'un support non métallique en polymère résorbable, dans ce cas précis un mélange d'acide poly (L-lactique) (PLLA) et poly (D,L-lactique) (PDLLA) qui permet l'élution dans le temps de médicaments. Son évaluation a été réalisée en position coronaire ¹⁴⁶.

Plusieurs interfaces polymères ont été proposées pour parvenir à une libération contrôlée et prolongée dans le temps de molécules thérapeutiques.

2.5.4.2. Les matrices polymères

Nous l'avons vu, excepté dans la configuration du système « polymer-free » de Dake ¹⁴³, il existe pour tous ces modèles de stents une matrice polymère qui va réguler la libération de la

molécule thérapeutique. Cette matrice polymère sert d'interface entre la surface métallique et la molécule thérapeutique. Elle doit répondre à un cahier des charges précis :

- Etre biocompatible
- Favoriser la mise à disposition de la molécule thérapeutique, sous une forme qui lui permet d'être efficace
- Ses caractéristiques de libération en termes de quantité de molécule thérapeutique, et de cinétique de libération doivent être définies
- Son intégrité et l'ensemble de ses propriétés physico-chimiques doivent être conservées après stérilisation et après implantation

Deux types de matrice peuvent être utilisées¹⁴⁷ :

- Les matrices polymères **non résorbables**, parmi lesquelles :
 - Le polyvinyl pyrrolidone / polyuréthane^{148, 149}
 - Le polydiméthylsiloxane (silicone)¹⁵⁰
 - Le polyéthylène téréphtalate (PET)^{151, 152}
 - Le poly (éthylène-co-vinyl acétate) (PEVA) / le poly (n-butyl méthacrylate) (PBMA)¹⁵³
 - Le poly styrène isobutylène styrène (SIBS)^{154, 155}
- Les matrices polymères **résorbables**, parmi lesquelles :
 - L'acide poly(lactique) (PLA)¹⁵⁶,
 - L'acide poly(D,L-lactique) (PDLLA)¹⁵⁷
 - L'acide poly-co-glycolique-co-lactique (PLGA)¹⁵⁸,
 - L'acide polyvinylique (PVA)^{159, 160}
 - Le polyhydroxybutyrate valérate (PHBV)^{161, 162},
 - La phosphorylcholine^{163, 164}

L'acide poly(L-lactique) (PLLA) est un polymère résorbable dont la capacité à être chargé en molécules thérapeutiques et à les libérer dans le temps semble moins évidente ; cela reste plus controversé pour le polycaprolactone (PCL)^{165, 166}. Ils sont avant tout des polymères de support, et l'objectif de leur utilisation et de se substituer à la structure métallique qui compose le stent^{167, 168}. Je ne développerai pas ici les supports totalement biorésorbables actuellement en cours d'évaluation dont Zidar a été le premier à les décrire dans un modèle canin^{169, 170}.

L'hydrolyse représente le principal mécanisme de dégradation pour le PVA, PLA, PLLA, PDLLA, PLGA, ainsi que pour le PCL^{158, 171, 172}. D'autres polymères, comme le PHBV seront dégradés en CO₂ en conditions aérobies¹⁷³.

La réaction inflammatoire induite par ces polymères résorbables *in vitro* semblait bien inférieure par rapport aux polymères non résorbables ; mais la plupart des résultats sur des modèles *in vivo* ont des difficultés à le confirmer^{147, 174}.

La plupart de ces polymères, hormis la phosphorylcholine qui semble avoir son propre effet protecteur sur les mécanismes de resténose intrastent¹⁶³, ont vocation à adsorber et/ou à contrôler la libération de molécules thérapeutiques.

2.5.4.3. Molécules thérapeutiques

L'analogie de la physiopathologie du mécanisme prolifératif impliqué dans la resténose, avec les mécanismes de prolifération tumorale est souvent réalisée. Des drogues anti-tumorales ont donc été proposées.

Antitumorale/Immunosuppressive

Paclitaxel (Taxol)

Sirolimus (Rapamycine)

Biolimus

Tacrolimus

Zotarolimus

Everolimus

Pimecrolimus

Dexaméthasone

Cytochalasine D

Table 1 - listes des molécules antitumorales et immunosuppressives ayant montré une efficacité au moins in vitro après greffage sur stent

Les molécules agissant à différents niveaux du cycle cellulaire ont été testées (cf. *Table 1*) (*Figure 11*)^{78, 175-179}.

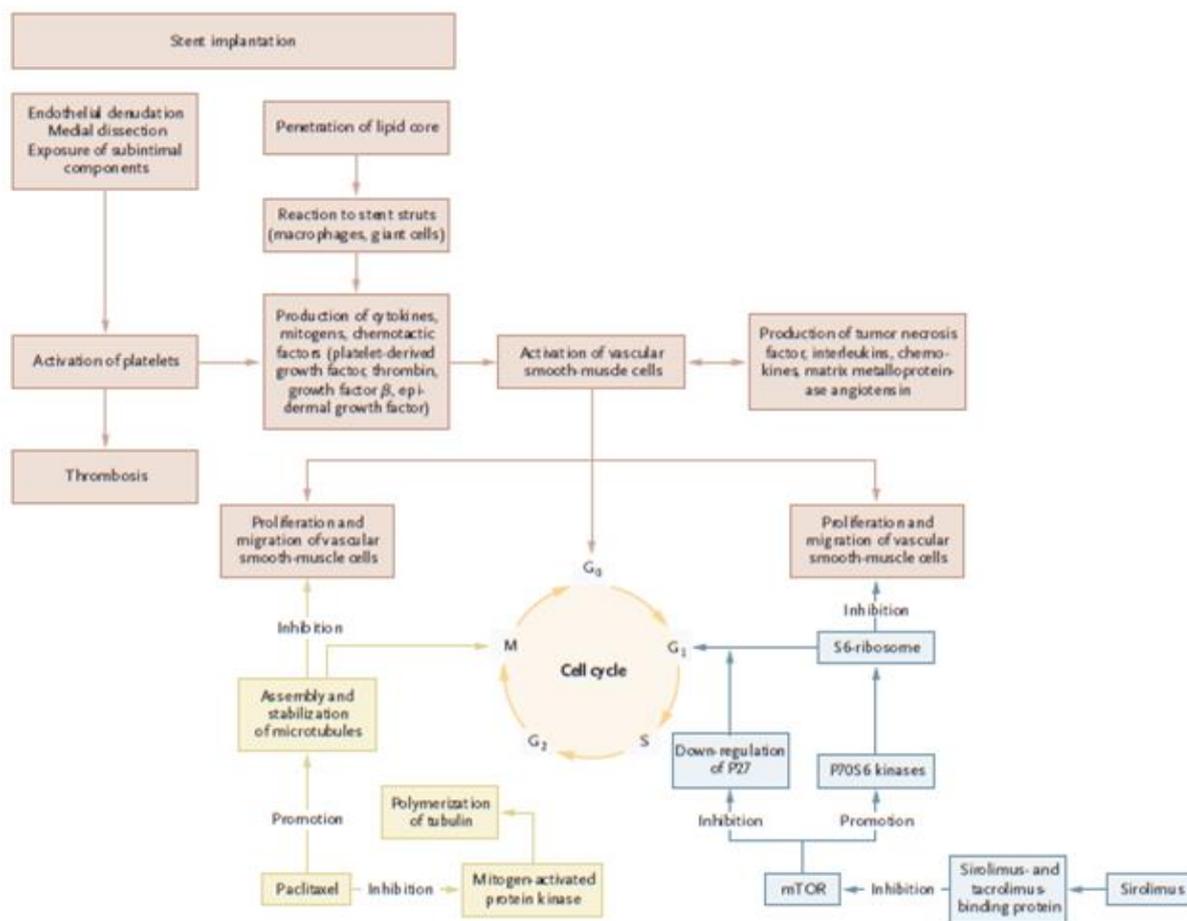


Figure 11 - Mécanismes cellulaires impliqués dans la resténose. On voit le site d'action du Sirolimus d'une part (inhibiteur mTOR, bloquant le cycle cellulaire en phase G₁) et du Paclitaxel d'autre part (dégradation du réseau de tubuline bloquant la mitose en prophase)¹⁸⁰

L'actinomycine D¹⁸¹ et le Tacrolimus¹⁸² initialement prometteurs ont déçus. Des molécules pro-cicatrisantes comme les complexes polysaccharidiques tels que les héparines (de bas poids moléculaire ou non fractionnées), ont montré une efficacité sur les mécanismes de resténose en limitant la prolifération des cellules musculaires lisses par des mécanismes encore mal compris^{183, 184}. D'autres molécules assimilées ou de structure proches semblent également d'intérêt tels que les héparane-sulfates, le fucoïdan^{185, 186}, et le perlecan¹⁸⁷. Le fucoïdan, libérerait le groupe glycosaminoglycane de la matrice extracellulaire qui mobilise les cellules progénitrices et participerait à l'angiogenèse en association avec le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) et le Fibroblast Growth factor (FGF). Son action inhibitrice sur la SMC reste plus floue¹⁸⁸.

Le peptide cyclique RGD (Arginine-Glycine-Aspartate)¹⁸⁹ semble favoriser l'endothélialisation par une liaison intégrine.

Une autre classe médicamenteuse, la famille des statines ¹⁹⁰, a fait ses preuves dans la prévention cardiovasculaire ¹⁹¹ et est actuellement en plein développement pour un usage *in-situ*. Plusieurs de ces statines interviennent à la fois dans la physiopathologie de l'athérosclérose et de la resténose (Table 2) ¹⁹¹⁻¹⁹⁴.

<u>Statines</u>
Atorvastatine
Simvastatine
Rosuvastatine
Pitavastatine
Pravastatine
Fluvastatine
<u>Cérvastatine (retirer)</u>

Table 2 - Molécules appartenant à la famille des statines

D'un point de vue structurel, elles ont toutes en commun une partie lactone (Figure 12) qui est le site actif.

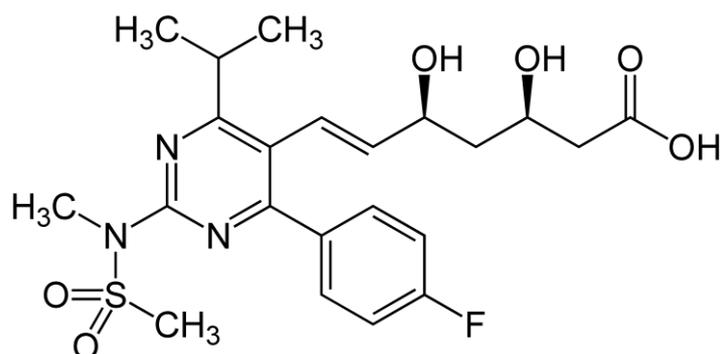


Figure 12 - Structure de la Rosuvastatine, caractérisée par la présence d'un groupement fluoré

Ces molécules ont un mode d'action multiple et sont donc dites pléiotropes : la principale propriété est son action bénéfique sur la fonction endothéliale ; effet qui dépend non seulement de la baisse du cholestérol-LDL, mais aussi d'une action directe sur la production de monoxyde d'azote (NO). Cet effet est précoce et durable ; il est lié aux processus d'oxydation et mérite une attention particulière puisque la dysfonction endothéliale est intimement liée au développement de l'athérosclérose. Une autre de ses propriétés est son effet anti-inflammatoire avec, chez les patients suivants un traitement par statines, une diminution des marqueurs circulants de l'inflammation (inhibent la libération des protéines de la phase aiguë de l'inflammation (IL6, TNF,...), et limitent l'activation des lymphocytes T) ¹⁹⁵. L'importance que revêt cet aspect est attribuable au fait que la resténose, comme l'athérosclérose, est une maladie à composante inflammatoire.

Actuellement, en pratique clinique, plusieurs stents actifs ont obtenu le marquage CE et sont inscrits sur la liste des produits et prestations remboursables (LPPR). Il y a en 5 pour le traitement des lésions coronaires (*Table 3*) et un seul pour le traitement des lésions fémorales superficielles : le stent Zilver PTX (Cook Medical, Bloomington, IN, USA).

Molécule	Nom commercial	Industriel
Sirolimus	CYPHER	Cordis, J&J, Warren, NJ, USA
Paclitaxel	TAXUS	Boston Scientific, Natick, MA, USA
Zotarolimus	ENDEAVOR	Medtronic, Santa Rosa, CA, USA
Everolimus	PROMUS	Boston Scientific, Natick, MA, USA
Everolimus	XIENCE	AbbotVascular, AbbottPark, IL, USA

Table 3 - Liste des stents actifs coronaires inscrits sur la LPPR

Pour rappel, le stent Cypher (Cordis, J&J, Warren, NJ, USA) a été retiré du marché en 2011. Autant de voies de recherche restent d'actualité, car les dispositifs proposés actuellement ne donnent pas entière satisfaction ; en effet, après des résultats initiaux encourageant sur la resténose avec les molécules antiprolifératives, les cliniciens ont été confrontés à moyen termes à un taux de thrombose tardive important ¹⁹⁶.

2.6. Limites des systèmes disponibles sur le marché

Le coût des stents à libération de molécule thérapeutique semble élevé par rapport au service rendu au patient ¹⁹⁷. L'incidence des thromboses tardives induites par les dispositifs actuels, à l'origine d'une morbi-mortalité importante rentre également dans le débat sur la légitimité de leur utilisation.

La thrombose tardive survient dans sa définition après le 30^{ème} jour suivant le geste de revascularisation. Sa fréquence est supérieure à celle constatée pour les stents nus. On estime son incidence entre 0,6 et 1,8% ; et tous les stents actifs ne semblent pas égaux face à cette complication ¹⁹⁸⁻²⁰¹.

Deux mécanismes physiopathologiques interviennent ²⁰² :

- ✓ Le retard de cicatrisation de l'endothélium induit par les molécules thérapeutiques utilisées ^{203, 204}.
- ✓ Le caractère pro-inflammatoire des polymères utilisés. C'est surtout vrai pour les premiers stents à libération de médicaments utilisés (Cypher et Taxus). Des études chez l'animal et l'homme ont mis en évidence cet écueil ²⁰⁵⁻²⁰⁷, avec la mise en évidence d'infiltrats lymphocytaires et d'une destruction de la média.

L'ensemble des voies de recherche tente ainsi de mettre au point un système **favorisant la cicatrisation** de la paroi artérielle en agissant sur les acteurs et les mécanismes de signalisation cellulaires impliqués. Les parties suivantes de ce mémoire décrivent notre approche de la thématique.

2.7. But et méthodologie des présents travaux

L'innovation dans ce projet de thèse a été de s'attacher à fonctionnaliser les stents, revêtements métalliques.

L'unité INSERM, au sein de laquelle j'ai menée à bien cette thèse, travaille depuis plusieurs années maintenant en partenariat avec l'UMET de l'université de Lille 1 sur les prothèses vasculaires en PET et leur fonctionnalisation ; l'ensemble de ces travaux a permis l'élaboration d'un brevet concernant le greffage de cyclodextrines sur ces prothèses.

Comme première approche sur le revêtement métallique et ce sera l'objet du premier chapitre, nous avons souhaité développer un système d'immobilisation simple de surface pouvant présenter une molécule d'intérêt thérapeutique ; la problématique en ce qui concerne les stents dans la pathologie occlusive artérielle est plus centrée sur les complications à type de resténose-thrombose intrastent – en comparaison avec le tissu qui est beaucoup plus exposé à l'infection²⁰⁸. La base développée pour ce dispositif nous a servi de socle dans un deuxième temps pour développer un système plus souple dans son utilisation : un dispositif permettant la libération de molécule d'intérêt thérapeutique dans le temps. Ce deuxième volet sera exposé dans le chapitre 2 de cette thèse.

3. Produits, Matériels et Méthodes

3.1. Matériels

Pour l'optimisation des paramètres de fonctionnalisation pour l'immobilisation ou pour la libération de principes actifs, des pastilles ont été découpées dans des barres métalliques de titane (\varnothing 15 mm, 2-3 mm d'épaisseur, Böhler-Edelstahl, Germany) et de CoCr (\varnothing 14,5 mm, 3 mm d'épaisseur, Böhler-Edelstahl, Germany)

Pour les essais *in vivo*, les stents ont été gracieusement fournis par la société AbbottVascular (Multi-linkVision de diamètre 2,5 mm par 12 mm, AbbottVascular, Inc., Santa Clara, CA, USA) et la société Cordis (Cypher de diamètre 2,5 mm par 15 mm, J&J, Warren, NJ, USA).

Les réactifs employés au cours des synthèses organiques proviennent des fournisseurs Sigma-Aldrich, Acros, Alfa Aesar et Fluka. L'eau ultra-pure (18.2 M Ω ·cm, Millipore Milli-Q system, Merck KGaA, Germany) a été utilisée pour toutes les préparations et pour les étapes de lavages des échantillons. Les autres solvants ont été distillés avant emploi.

3.2. Produits et principes actifs

3.2.1. Dopamine

La poudre de dopamine hydrochloride et le tampon Trizma® (**2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol**) (Figure 13) proviennent de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

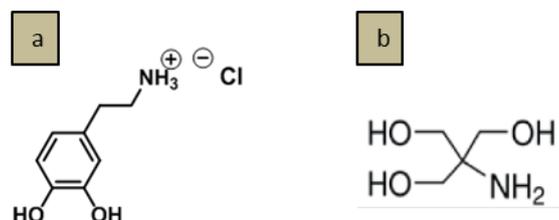


Figure 13 - Formule de la dopamine (a) et du tris (b)

3.2.2. Cyclodextrines, catalyseur et acide citrique

Deux CDs de la famille des β -cyclodextrines ont été sélectionnées : la β -cyclodextrine native (β CD, Kleptose®, Roquette Frères, Lestrem, France) et son dérivé la 2-0-méthyl- β -cyclodextrine (Me β CD, Crysmeb®, DS=0.50, Roquette Frères, Lestrem, France). Le choix de ces 2 CDs est basé sur les résultats antérieurs de notre équipe^{209, 210}.

L'acide polycarboxylique (PCA) utilisé dans notre étude est l'acide citrique (CTR, Sigma-Aldrich) (Figure 14). Il est utilisé comme agent réticulant dans la réaction d'estérification du polymère de cyclodextrine.

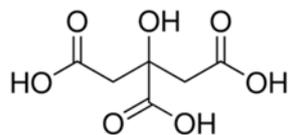


Figure 14 - Formule de l'acide citrique (CTR) utilisé

L'hypophosphite de sodium (NaH_2PO_2 , Sigma Aldrich) est un catalyseur ajouté au mélange acide polycarboxylique/cyclodextrine dans la réaction d'estérification qui formera le polymère de cyclodextrine (PCD) (Figure 15). Son action catalytique intervient au niveau de la formation de l'anhydride qui est un intermédiaire réactionnel dans la réaction de polycondensation entre le CTR et la CD.

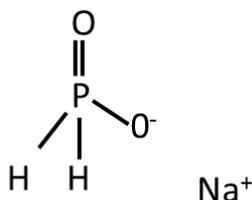


Figure 15 - Formule du catalyseur (NaH_2PO_2) utilisé

3.2.3. Les principes actifs

Le Paclitaxel (PTX) et la simvastatine proviennent de chez INRESA Médical (BARTENHEIM, France) (Figure 16).

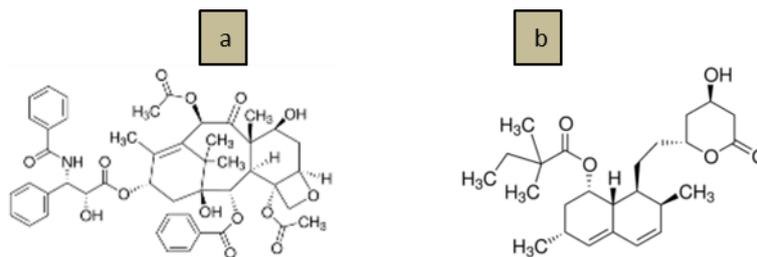


Figure 16 - Formule du PTX et de la simvastatine

3.2.4. La glucosamine

La glucosamine (GluNH_2) a été achetée chez Sigma (Figure 17).

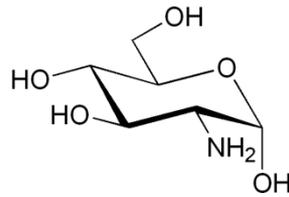


Figure 17 - Formule de la glucosamine

3.3. Méthodes

3.3.1. Oxydation des surfaces métalliques

3.3.1.1. Préparation des échantillons

Les échantillons métalliques (CoCr et Titane) utilisés sont obtenus par découpe de barres cylindriques de Ti40 (normes ISO-13485) de 15 mm de diamètre et de CoCr (normes ISO 5832-12) de 14.5 mm de diamètre. Des pastilles d'une épaisseur de 3 mm sont obtenues avec une tronçonneuse par un disque de 20S25 (Struers Inc., Strongsville, OH, USA) puis à la micro-tronçonneuse par un disque AO01043 (Presi Inc., Brié et Angonnes, France) et enfin polies mécaniquement. Un protocole spécifique de polissage utilisant une polisseuse automatique a été mis au point afin de garantir la qualité constante des états de surface. Des disques de polissage avec une taille de grains décroissante (600, 1200 puis 2400 et supra5) sont utilisés. Afin d'obtenir une finition dite « miroir », nous terminons le polissage mécanique avec une solution colloïdale de carbure de silicium (SPM 1/10 μm).



Figure 18 - photo de la polisseuse automatique PHOENIX 4000, (Buehler, Germany) permettant de polir 6 pastilles à la fois ; le temps, la pression et la vitesse de rotation sont déterminés par l'opérateur

Le diamètre des échantillons est adapté au diamètre des puits des boîtes utilisées pour les tests biologiques et au montage des pastilles sur la polisseuse automatique par lot de 6 (Figure 18). De cette façon, le polissage est rapide et homogène pour tous les échantillons.

Les pastilles sont ensuite nettoyées aux ultrasons dans des bains successifs d'eau, d'acétone et d'éthanol pour les débarrasser des débris engendrés et stériliser les échantillons. Nous obtenons ainsi un état de surface dit « miroir ».

Remarque : dans le cadre d'une application clinique, il est également possible d'améliorer l'état de surface de ces pastilles par un plasma froid Argon/Hydrogène afin de décaper et d'homogénéiser la surface ; les résidus de matières organiques sur les pièces métalliques pourraient ainsi également être éliminés (procédé utilisé dans l'industrie pour la fabrication de prothèses orthopédiques).

3.3.1.2. Oxydation des échantillons

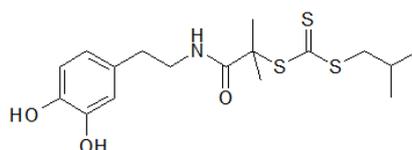
Le titane se passive naturellement dans l'eau ou au contact de l'air pour former une couche d'oxyde comportant des fonctions hydroxyles. Afin d'augmenter l'épaisseur de cette couche et la densité de fonctions hydroxyles en surface nécessaires au greffage des polymères via l'ancre catéchol, les échantillons de titane sont plongés pendant 2 minutes dans une solution oxydante dite « piranha », (mélange 1:1 de H₂O₂ (à 30%) et de H₂SO₄ (à 96%)).

Le CoCr, avec son excellente résistance à la corrosion, est plus difficile à oxyder que le Titane. En se basant sur les travaux de Vetrone *et al.*²¹¹, le ratio de acide sulfurique / peroxyde d'hydrogène (H₂SO₄/H₂O₂) a été considérablement augmenté pour atteindre 70% / 30% avec un temps d'immersion de la pastille dans la solution oxydante de plus de 60h²¹².

Après oxydation, la réaction est stoppée par immersion des pastilles de Titane et de CoCr dans un bain d'eau ultra-pure. Les pastilles sont ensuite nettoyées par 4 bains d'eau pure successifs de 30 min chacun aux ultrasons. Ce rinçage permet d'éliminer les sulfates résiduels présents en surface.

3.3.2. Fonctionnalisation par immobilisation du principe actif

3.3.2.1. Synthèse et caractérisation du *N*-(3,4-dihydroxyphényléthyl)-2-(1-isobutyl) sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionamide (= dopamine-RAFT)



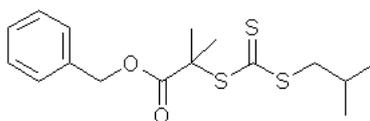
L'agent de transfert RAFT (5,0 g, 14,3 mmol)²¹³ et le chlorhydrate de dopamine (3,0 g, 15,8 mmol) sont dissous dans du méthanol (150 ml) à température ambiante sous atmosphère d'azote. Au bout de 20 min, de la triéthylamine (2,4 ml, 17,2 mmol) est ajoutée progressivement et la solution est agitée pendant 48h à l'abri de la lumière. Le solvant est évaporé pour donner une huile orange. Ce produit brut est dissous dans de l'éther diéthylique (50 ml) puis lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (5x20 ml), de l'eau distillée (2x20 mL) puis séchée sur MgSO₄. Après filtration, la solution est évaporée. Le produit est finalement précipité dans l'hexane pour donner un solide jaune orangé avec un rendement de 70%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm/TMS) : 0,94 (d, *J* = 6,7 Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 1,58 (s, 6H, C(CH₃)₂), 1,89 (m, 1H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 2,6 (t, *J* = 7,0 Hz, 2H, CH₂-CH₂-Aryl), 3,10 (d,

$J = 6,9$ Hz, 2H, S-CH₂-CH), 3,37 (q, 2H, NH-CH₂-CH₂), 6,1 (bs, 1H, Aryl-OH), 6,47 (dd, 1H Aryl-H_d), 6,62 (t, 1H, CO-NH-CH₂), 6,73 (d, 1H, Aryl-H_b), 6,65 (s, 1H, Aryl-H_c), 7,15 (bs, 1H, Aryl-OH).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : 22,1 (C(CH₃)₂), 25,8 (CH(CH₃)₂), 27,8 (CH(CH₃)₂), 34,5 (CH₂-CH₂-NH), 41,8 (CH₂-CH₂-NH), 45,5 (S-CH₂-CH), 57,0 (C(CH₃)₂), 115,2, 115,4, 120,7 (C_{aryl}-H), 130,6 (C_{aryl}-CH₂), 142,9, 144,2 (C_{aryl}-OH), 173,5 (C=O), 220,1 (C=S).

3.3.2.2. Synthèse et caractérisation du 2-(1-isobutyl)sulfanylthiocarbonylsulfanyl-2-méthylpropionate de benzyle (agent de transfert benzyl-RAFT)



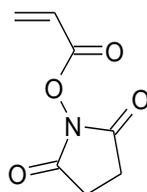
Une solution d'alcool benzylique (1,57 g, 14,4 mmol) dans du CH₂Cl₂ (50 ml) est ajoutée lentement, à température ambiante et sous atmosphère d'azote, à une solution de CH₂Cl₂ (200 ml) contenant l'ester activé (3,0 g, 12,0 mmol), la DCC (3,0 g, 14,5 mmol) et la 4-diméthylaminopyridine (DMAP, 1,5 g, 12,0 mmol). Le mélange est agité pendant une nuit. Après filtration, la solution est lavée à l'eau distillée (3x50ml), et séchée sur MgSO₄. Le solvant est évaporé et le résidu est purifié sur une colonne de silice (CH₂Cl₂ : éther de pétrole 1:1). Rendement : 70%.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm/TMS) : 0,92 (d, $J = 6,7$ Hz, 6H, CH-(CH₃)₂), 1,64 (s, 6H C(CH₃)₂), 1,88 (m, 1H, CH₂-CH-(CH₃)₂), 3,10 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H, S-CH₂-CH), 5,05 (s, 2H, C₆H₅-CH₂-O), 7,26 (m, 5H, C₆H₅-CH₂).

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) : 22,1 (C(CH₃)₂), 25,4 (CH(CH₃)₂), 27,8 (CH(CH₃)₂), 45,2 (S-CH₂-CH), 56,0 (C(CH₃)₂), 67,7 (C₆H₅-CH₂-O), 128,1, 128,5, 135,6 (C₆H₅-CH₂), 172,9 (C=O), 221,5 (C=S).

3.3.2.3. Synthèse et caractérisation du monomère *N*-acryloyloxysuccinimide (NAS) et des (co)polymères de pNAS (poly(*N*-acryloyloxysuccinimide))

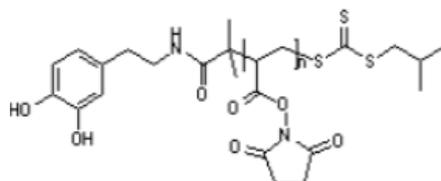
3.3.2.3.1. Monomère de NAS



Pour synthétiser le monomère de NAS, 17,25g (15 mmol) de NHS (*N*-hydroxysuccinimide) et 24.6 mL de triéthylamine (Et₃) (18 mmol) sont dissouts dans 240ml de chloroforme ; et le mélange est placé sous atmosphère d'azote à 0°C. 14,7ml de chlorure d'acryloyle (18 mmol) sont alors ajoutés goutte-à-goutte et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 4h à 0°C. La phase organique est lavée par une solution saturée de NaHCO₃ (3x50 ml) puis séchée sur MgSO₄. Le CHCl₃ est évaporé et le produit est recristallisé dans un mélange éther diéthylique/hexanes (1:1) pour donner un solide blanc. Rendement 82%.

3.3.2.3.2. Polymère d'esters activés (pNAS).

3.3.2.3.2.1. Polymérisations du NAS : procédure générale



Dans un tube de Schlenk sont introduits l'agent de transfert dopamine-RAFT ou benzyl-RAFT, l'amorceur de polymérisation AIBN, et le monomère de NAS. Après dissolution des composés (DMF pour le NAS et toluène pour l'amorceur), la solution est purgée à l'azote pendant 30 min à 0°C. Le tube Schlenk est ensuite transféré dans un bain d'huile placé à la température de polymérisation désirée. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers pour déterminer le taux de conversion, la masse molaire moyenne (en nombre M_n) et l'indice de polymolécularité (\bar{D}). En fin de réaction, le polymère est précipité dans un non-solvant (méthanol).

3.3.2.3.2.2. Purification des polymères

Les polymères d'esters activés (pNAS) ont été purifiés en deux étapes :

- Trituration du polymère dans une solution de chloroforme, solvant du monomère pendant 1h puis filtration.
- Trituration brève du polymère dans de l'éther diéthylique, puis filtration. Enfin, les polymères sont séchés sous vide.

3.3.3. Fonctionnalisation par libération du principe actif

Après l'étape de polissage et d'oxydation des revêtements métalliques, la fonctionnalisation des pastilles et/ou des stents se fait en deux étapes : greffage de la couche de polydopamine (PDA) et greffage de la couche de polymère de cyclodextrine (PCD).

3.3.3.1. Greffage de la couche de polydopamine (PDA).

Pour ce faire, les pastilles sont immergées dans 5 ml d'une solution de dopamine à 2 mg/ml. Cette solution est alcalinisée par une solution de tampon Trizma à 10 mM ajustée à pH 8,5 à l'aide d'une solution de soude à 0,1 M [les échantillons issus de ce procédé seront nommés CoCr-PDA dans le manuscrit].

La réaction est réalisée à température ambiante sous agitation (400 rpm), l'influence de la durée de la réaction sera évaluée (1h et 16h). Les pastilles recouvertes de PDA sont ensuite rincées à l'eau puis placées ou non dans un four ventilé. 4 températures de recuit seront évaluées (150°C, 160°C, 170°C or 180°C) pour des durées variables (20, 30, 45 et 60 minutes) [Les échantillons seront notés CoCr-PDA150, 160, 170 et 180 et CoCr-PDA20, 30, 45 et 60 dans le manuscrit].

3.3.3.2. Greffage de la couche de polycyclodextrine (PCD).

Les pastilles fonctionnalisées par une monocouche de polydopamine recuite ou non sont ensuite immergées pendant 10 minutes (37°C, 80rpm) dans 10 ml d'une solution contenant Me β CD ou β CD/ Na₂H₂PO₂/CTR avec un ratio de 10/3/10 (g/100 ml d'eau ultrapure). Les pastilles sont ensuite séchées à 90°C pendant 30 minutes au four ventilé. Finalement, la réaction de polycondensation des CDs (Me β CD ou β CD) sera étudiée à 3 températures (140, 150 et 160°C) et 4 durées de fixation (20, 30, 45 et 60 minutes)²¹⁴. [Les échantillons seront notés CoCr-PDA-PMe β CD ou P β CD]. Afin d'optimiser la cytocompatibilité du produit final, plusieurs procédés de rinçage ainsi qu'une étape de neutralisation ont été comparés : La simple immersion dans un bain d'eau, une extraction Soxhlet à l'eau ou la neutralisation dans 10ml d'une solution de Na₂CO₃ à 4 g/l pendant 10min sous agitation douce (80 rpm).

3.3.4. Méthode de caractérisation physico-chimiques

3.3.4.1. Quantification colorimétrique du revêtement PDA-PCD

Le procédé de greffage de la PDA ainsi que de la PMe β CD ou P β CD a été optimisé afin de pouvoir charger le maximum de molécule thérapeutique sur le support avec la cinétique de

libération la plus longue possible. Le greffage de la PDA fait intervenir des amines sur la surface des pastilles fonctionnalisées, ces dernières seront quantifiées par l'acide orange II (AO) ^{215, 216}. Le greffage de la PCD génère des cyclodextrines et des fonctions carboxyliques qui sont quantifiées à l'aide du TBO (Toluidine Blue Ortho), par interactions ioniques avec les fonctions carboxylates ²¹⁷ et hydrophobes avec les CDs ²¹⁸. La spectrophotométrie UV-visible a été utilisée pour quantifier le TBO et l'AOII dans les différentes solutions de libération/extraction et ainsi optimiser le procédé de fonctionnalisation. L'appareil est un modèle UV-1800 de Shimadzu d'une résolution inférieure à 1 nm sur une gamme allant de 190 à 1100 nm.

3.3.4.1.1. Quantification du PCD par le Toluidine Blue Ortho

Le Bleu de Toluidine Ortho (TBO) ou chlorhydrate de triméthylthionine, est un colorant bleu chargé positivement (Figure 19). Dans cette étude, il est utilisé pour quantifier de manière semi-quantitative le PCD greffé sur CoCr-PDA (Figure 20).

Cette méthode permet également d'évaluer la cinétique de libération du TBO adsorbé sur les pastilles fonctionnalisées et de quantifier le TBO adsorbé sur ces dernières avant et après dégradation dans le PBS ou le milieu de culture (Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany)) selon le protocole défini en annexe 1, grâce aux lois de Beer-Lambert établie auparavant pour chaque couple TBO / solvant.

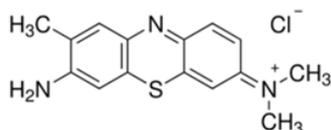


Figure 19 - Formule du Bleu de Toluidine Ortho

Imprégnation des pastilles fonctionnalisées dans le TBO :

Les échantillons (Ø 14,5 mm) sont imprégnés dans 20 ml de TBO à $5 \cdot 10^{-4}$ M (pH ajusté à 10 avec la soude à 10^{-1} M) pendant 4 heures à 30°C sous agitation (80 rpm) et à l'abri de la lumière. Ils sont ensuite lavés 2 fois pendant 5 minutes dans 10 ml de soude à 10^{-4} M pour éliminer le TBO non complexé.

Dosage quantitatif du TBO adsorbé sur les pastilles

Après l'étape d'imprégnation/rinçage, les échantillons sont plongés 20 minutes dans 20 ml d'acide acétique à 50% à l'abri de la lumière afin de désorber le TBO. Les solutions obtenues

sont analysées par spectrophotométrie UV-Visible à une longueur d'onde de 633 nm ^{215, 219} (TBO/acide acétique 50% v/v : $\epsilon=74,48 \text{ L mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).

Evaluation de la cinétique de libération du TBO adsorbé sur les pastilles :

Après l'étape d'imprégnation/rinçage, les échantillons sont plongés dans 10 ml de PBS (pH 7,4) à 37°C sous agitation (80 rpm). Des prélèvements (10 mL) réguliers sont réalisés et dosés par spectrophotométrie UV-Visible à une longueur d'onde de 288 nm (TBO/PBS : $\epsilon= 33,89 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Les 10 mL de PBS prélevés sont renouvelés après chaque prélèvement avec du PBS frais.

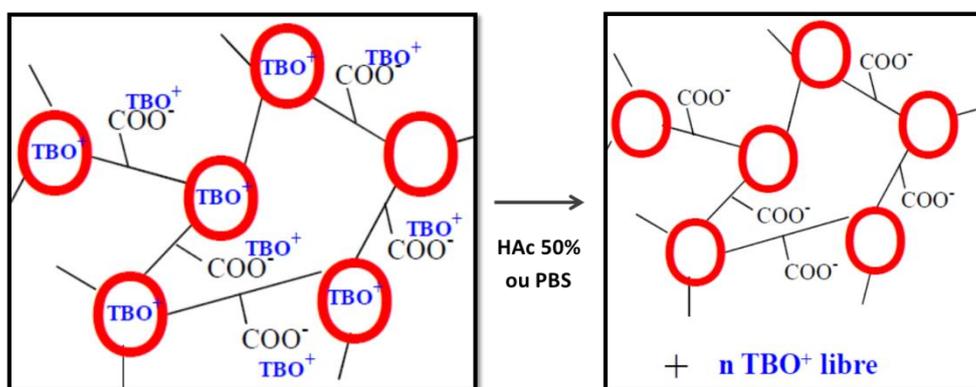


Figure 20 - Illustration du principe de complexation du TBO par le polymère de CD puis le dosage (HAc : acide acétique) ou la cinétique de libération (PBS) du TBO.

Les résultats des cinétiques de libération sont normalisés par rapport à la quantité cumulée totale de TBO libérée

3.3.4.1.2. Quantification du PDA par l'Acide orange II (AO)

Cette méthode permet de quantifier l'AO adsorbé sur les pastilles et/ou stents après greffage de la PDA et ainsi d'optimiser la méthode de greffage. Cette méthode a été utilisée uniquement pour optimiser le traitement thermique appliqué à la couche de PDA.

Chaque pastille est immergée dans 20 ml d'une solution d'AO à $2,5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ ajustée à pH 3 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,5 M. Le temps d'immersion est d'une nuit sous agitation (80rpm) à température ambiante.

L'AO non complexé au substrat est éliminé à l'aide de 2 rinçages par immersion de la pastille dans 20 ml d'eau acidifiée (pH 3) pendant 5 min sous agitation (80 rpm). La désorption de l'AO complexé au substrat se fait par immersion de la pastille dans 10 ml d'eau à pH=12, pendant 3h sous agitation (80 rpm) à température ambiante. Enfin, chaque solution est ajustée

à pH=3 avec 1 ml d'HCl 10^{-1} M pour un dosage UV à 485 nm²¹⁵. (AO/HCL pH3 : $\epsilon= 19,16L \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.3.4.2. Quantification des principes actifs (Paclitaxel et statine)

Diagramme de solubilité du PTX ou de la simvastatine avec le polymère de CD (PMe β CD)

Les diagrammes de solubilité des principes actifs (PTX ou simvastatine) ont été réalisés avec de l'eau ultra-pure (témoin négatif). La Me β CD et le PMe β CD ont été dissous dans de l'eau ultra-pure à différentes concentrations (10, 20, 30, 40, and 50 mg/ml) puis 10 mg de principe actif ont été ajoutés. Après 12 heures sous agitation douce à température ambiante, l'excès de principe actif non dissous en solution a été éliminé par filtration en utilisant une membrane de cellulose à 0,45 μm . Les différentes concentrations des solutions obtenues ont été quantifiées par HPLC couplée à l'UV à 230 nm (PTX) et 238nm (simvastatine).

Évaluation de la quantité de molécules thérapeutiques adsorbées sur le revêtement

Les pastilles de CoCr fonctionnalisées CoCr ont été immergées pendant 12 heures dans une solution éthanoïque à 70% (5 ml) contenant les principes actifs (PTX ou simvastatine) à des concentrations de 1g/L et 10g/L. Après l'étape d'adsorption, les échantillons ont été rincés dans l'eau pour précipiter l'excès de principe actif. La désorption du principe actif se fait pendant 12 heures dans 3 ml d'une solution d'acétonitrile/eau (ratio 40:60) ou d'éthanol/eau (ratio 70 :30) pour le PTX et la simvastatine respectivement. La solution est finalement filtrée par une membrane de PTFE de 0,45 μm . La quantité de paclitaxel et de simvastatine est déterminée par HPLC couplée à l'UV à 230 nm et 238 nm respectivement.

Évaluation de la cinétique de libération des molécules thérapeutiques

L'adsorption de principe actif sur les pastilles de CoCr s'opère comme décrit précédemment, c'est à dire par immersion dans une solution de 10g/L de principe actif.

Pour l'étude de libération, les pastilles sont immergées dans 5 ml de plasma humain frais (Etablissement Français du Sang - Nord de France, La Plaine Saint Denis, France) sous agitation douce (80rpm) à 37°C. À chaque point de libération (1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 et 168 heures (7 jours)), les puits contenant les pastilles sont vidés et 5 ml de plasma sanguin frais sont ajoutés pour poursuivre la libération. Pour chaque période, 3 pastilles ont été analysées par HPLC selon la méthode décrite ci-dessus.

3.3.4.3. Analyses par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Toutes les expériences de RMN ont été réalisées avec un spectromètre Bruker AVANCE 300 (Bruker AXS GmbH, Allemagne) du service commun de RMN de l'université de Lille 1 opérant à une fréquence de 300,09MHz en proton (RMN-¹H), à une température de 298°K (25°C). Les échantillons ont été préparés dans des tubes RMN de 5mm de diamètre.

3.3.4.4. Analyses par Chromatographie par Perméation de Gel (GPC)

La Chromatographie par perméation de gel ou d'exclusion stérique est une méthode de chromatographie en phase liquide permettant de séparer des macromolécules en fonction de leur volume hydrodynamique. Elle est également utilisée pour évaluer la distribution des volumes hydrodynamiques dans un échantillon de polymères.

Les mesures GPC ont été menées sur deux chaînes GPC Waters, l'une utilisant comme phase mobile du THF (tétrahydrofurane) à 40°C à un débit de 1 ml.min⁻¹ (phase fixe : 2 colonnes HR4), l'autre la DMF à 50°C au débit de 0,3 ml.min⁻¹ (phase fixe : 2 colonnes HT3). Les masses molaires et les indices de polymolécularité des différents polymères analysés proviennent de la mesure de l'angle de réfraction, dont la courbe de calibration a été réalisée à partir de standards en polystyrène (Polymer Standard Service) pour la chaîne GPC THF et en PMMA (Poly(methacrylic acid methyl ester), Sigma-Aldrich) pour la chaîne GPC DMF.

3.3.4.5. Etudes de voltampérométrie cyclique

Les études de voltampérométrie cyclique ont été réalisées au moyen d'un potentiostat Autolab PGSTAT 30. La cellule d'électrolyse est ici composée de trois électrodes : une électrode de travail en platine ou en titane, une électrode auxiliaire (fil de platine ou pièce de titane) et une électrode de référence (Ag/AgCl).

3.3.4.6. Microscopie optique

Les images optiques ont été prises à l'aide d'un microscope optique Olympus BX41 (grossissements x5, x20 et x50).

3.3.4.7. Microscopie électronique à balayage

La microscopie électronique à balayage (MEB) est basée sur l'interaction d'électrons avec la surface du substrat, ce qui fournit des images en haute résolution de la surface de l'échantillon. Après métallisation et application du vide, les échantillons sont observés au MEB afin d'observer la morphologie des couches de PDA et de PMe β CD greffées sur le

CoCr et/ou le stent. Le MEB (Hitachi S-4700 SEM FEG, Japan) est réglé sur entre 20 et 35kV et 50 μ A lors des observations (Figure 21).

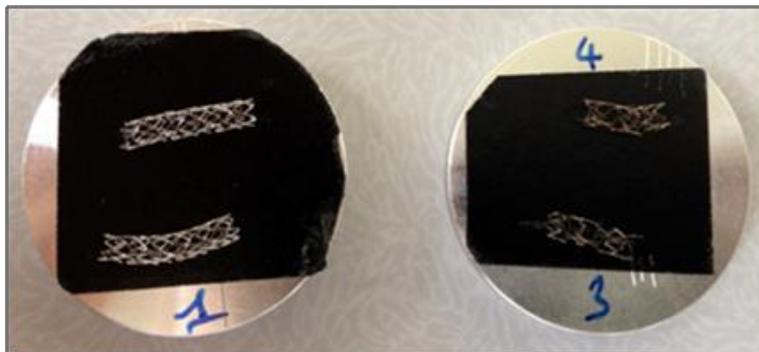


Figure 21 - Préparation des stents (1 : CoCr nu, 2 : CoCr oxydé, 3 : CoCr fonctionnalisé par PDA, 4 : CoCr fonctionnalisé par PDA-PM β CD) sur les supports permettant leur analyse en MEB - photo prise avant l'étape de pulvérisation du film de carbone (métallisation)

3.3.4.8. Ellipsométrie

L'ellipsométrie est une méthode de caractérisation de surface permettant d'évaluer l'épaisseur de la couche greffée en surface des échantillons. Elle est basée sur le changement de polarisation d'un faisceau lumineux au contact du substrat. Les mesures réalisées par l'ellipsomètre spectroscopique dans ce chapitre ont été effectuées à l'aide d'un ellipsomètre UVISEL HR460 (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France) à des longueurs d'ondes variant de 300 à 1500 nm avec 1 nm d'intervalle. L'incidence de l'angle du faisceau a été fixée à 70° pour l'ensemble des mesures réalisées. L'ensemble des variations d'angle enregistré a pu être analysé à l'aide du logiciel Delta-Psi Horiba (Horiba Scientific, Villeneuve d'Ascq, France).

3.3.5. Evaluation biologique *in vitro*

Ces différentes techniques sont décrites de manière exhaustive en annexe 1 et sont issues de la norme 10993-5 relative à la cytocompatibilité des Dispositifs Médicaux et à la norme 10993-4 relatives aux interactions avec le sang⁴⁰.

3.3.5.1. Viabilité cellulaire

Ce test consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent la concentration létale 50% (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies avec des cellules épithéliales embryonnaires pulmonaires humaines: lignée L132 (ATCC®-CCL5)^{220, 221}. Ces cellules ont été utilisées dans notre étude car:

- Elles font partie des lignées cellulaires recommandées par les normes internationales d'évaluation de la biocompatibilité^{39,40}.
- La lignée cellulaire L132 est extrêmement sensible à la cytotoxicité et réagit avec une reproductibilité très constante.
- Elles ont un coefficient de clonage élevé (37%).

Quarante-huit heures avant le test, les cellules sont préalablementensemencées dans des boîtes de culture (T25) pour qu'elles se trouvent dans une phase exponentielle de prolifération le jour de la manipulation. Après décollement à la trypsine et comptage, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Nunc®) à la densité initiale de 300 cellules/boîte pour obtenir environ 100 colonies par boîte de culture au 9^{ème} jour. Les cellules sont exposées en continu dans 5 ml de milieu à des concentrations croissantes de poudres (0; 25; 50; 100; 200; 250 et 400 µg/ml) de PDA, PCD et de PDA-PCD. Le milieu de culture est le MEM de Eagle (Eurobio), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau foetal (SVF, Eurobio). Le milieu contient 25 µg/ml de fungizone comme antifongique et 50 µg/ml de gentamicine comme antibiotique.

Après 9 jours d'incubation à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂, les cellules formant des clones sont colorées avec le Violet Cristal. Après séchage, les clones sont comptés tout en écartant ceux contenant moins de 25-30 cellules (Figure 22). L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé selon les formules suivantes et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0µg/ml).

Le calcul est le suivant :

Culture contrôle C : Nombre de colonies × 100/ nombre de cellules= XC%

Culture exposée E : Nombre de colonies × 100/ nombre de cellules= XE%

Avec ERC (%) = (XE × 100) / XC

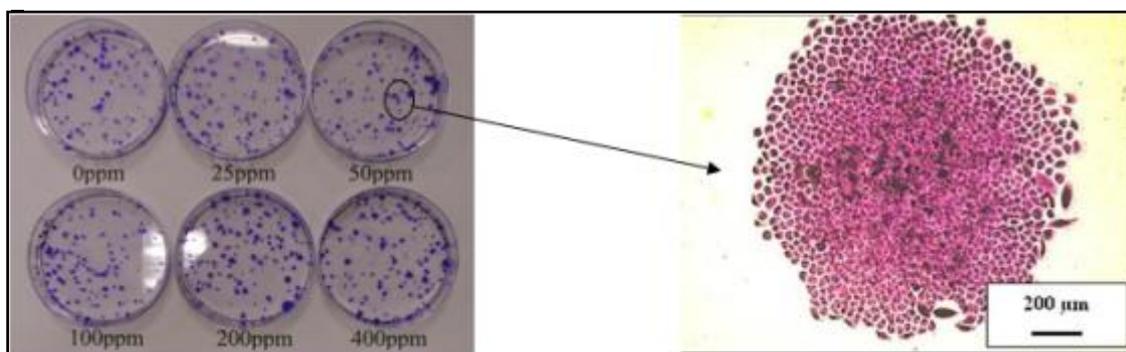


Figure 22 - Boîtes de clones après 9 jours d'incubation en présence des poudres testées et coloration (gauche) et vue microscopique d'un clone (droite).

3.3.5.2. Vitalité et prolifération cellulaire

Le test de la vitalité cellulaire consiste à quantifier la vitalité des cellules présentes sur le support par l'intermédiaire d'un dosage en spectroscopie par fluorescence. Le test de la prolifération cellulaire consiste quant à lui à déterminer la croissance cellulaire *in vitro* par comptage sur un support. Ces tests nécessitent des cellules d'origine humaine ou animale apparentées aux milieux pour lequel le biomatériau est destiné. Dans notre cas, les cellules endothéliales HUVEC (Human Umbilical Vascular Endothelial Cells) et les cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 (origine murine, (296)) ont été testées (annexe 1). Ce test sera également réalisé avec une lignée cellulaire endothéliale immortalisées par l'équipe de Kirkpatrick en 2001²²², les HPMEC-ST1.6R (human pulmonary microvascular endothelial cell line). Cette lignée de cellules, est entretenue dans un milieu de culture de type ECGM MV pour Endothelial Cell Growth Medium MV (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) enrichi en Endothelial Cell Growth SupplementMix (Promocell GmbH, Heidelberg, Germany), en streptomycine (0,1 g/l) et pénicilline (100 IU/ml), à 37°C dans un incubateur à CO₂ (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) réglé à 5% de CO₂ pour 95% d'atmosphère et un pourcentage d'humidité à 100%.

La période de culture est de 3 et 6 jours sans changement de milieu²²³⁻²²⁵. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport au témoin (fond du puits en polystyrène : TCPS).

3.3.5.3. Hémolyse

Un prélèvement sanguin veineux est réalisé chez un sujet sain (consentant). Il est collecté dans un tube en polypropylène (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company) en présence d'EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid).

Il est ensuite dilué dans le PBS pour obtenir une concentration totale en hémoglobine de 10 g·L⁻¹. 1 ml de sang dilué est ajouté dans une plaque multi-puits contenant le substrat à testé (n=3) ou les substrats contrôles (sang dilué dans le PBS, contrôle négatif et NaCO₃ à 1% comme contrôle positif ; n=3 pour chaque groupe). La plaque multi-puits est placée sous agitation douce (80 rpm) à 37°C pendant 1h. La suspension est ensuite collectée et centrifugée à 3000 rpm pendant 10 minutes et l'hémoglobine présente dans le surnageant est analysée par spectrophotométrie à 540 nm.

On peut ainsi calculer l'index hémolytique (HI), comme décrit dans la Figure 23 qui permet de définir activité hémolytique du substrat analysé. Ces données sont exprimées en pourcentage ± SD. L'HI est considéré comme satisfaisant s'il est inférieur à 5%.

$$\% \text{Hemolysis} = \frac{\left[\text{OD}_{\text{test sample}} - \text{OD}_{\text{negative control}} \right]}{\left[\text{OD}_{\text{positive control}} - \text{OD}_{\text{negative control}} \right]} \times 100$$

Figure 23 - Calcul de l'index d'hémolyse (OD=densité optique)

3.3.6. Evaluation *in vivo* des stents fonctionnalisés

Après optimisation de l'ensemble des paramètres du procédé de fonctionnalisation des pastilles, nous avons transféré la méthodologie au stent vasculaire.

Les laboratoires AbbottVascular nous ont gracieusement fourni plusieurs dizaines de stents CoCr coronaires (Multi-linkVision de diamètre 2,5mm par 12mm (Figure 24), nous permettant de les fonctionnaliser selon le procédé mis au point sur la pastille.

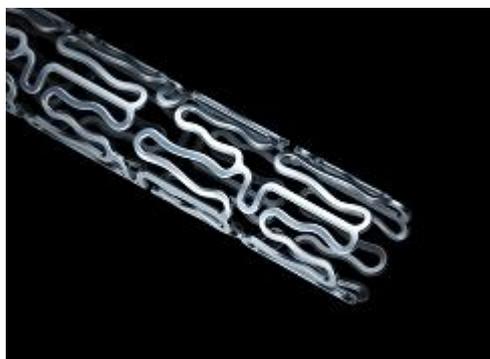


Figure 24 - Stent CoCr coronaire MultilinkVision, AbbottVascular

La fonctionnalisation du stent pour la libération de principe actif suit les mêmes étapes que les pastilles. Avant fonctionnalisation, les stents sont dessertis de leur ballon par inflation à 6 bars. Après fonctionnalisation, les stents sont ressertis manuellement sur leur ballon d'origine, puis stérilisés par immersion dans un bain d'éthanol (alcool éthylique) absolu de 2 minutes.

Le procédé de stérilisation habituellement appliqué aux stents est celui des rayonnements gamma (γ) répondant à la norme EN 285.

Les protocoles d'expérimentation 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. La méthodologie est celle utilisée lors des travaux de thèse de Blandine Maurel sur le modèle animal de resténose²²⁶.

Les expériences étaient réalisées sur des aortes abdominales de rats mâles Wistar (400-450 g, Elevage Charles Rivers, France)²²⁷. Avant l'implantation, les animaux étaient séparés de façon aléatoire en animaux témoins ou en animaux traités. Sous anesthésie générale et après

héparinisation systémique (héparine non fractionnée 100 UI/kg IV), l'aorte était clampée en sous-rénale et une aortotomie était réalisée pour l'introduction du stent juste en amont de la bifurcation aorto-iliaque. Les stents étaient déployés à leur pression nominale, soit 8 atmosphères durant 10 secondes. En postopératoire, aucun antiagrégant plaquettaire ne leur était administré.

Les animaux ont été sacrifiés 28 jours après l'implantation du stent. Le segment d'aorte abdominale traité par stent était prélevé avant euthanasie par exsanguination sur animaux anesthésiés. L'aorte traitée était fixée par le paraformaldéhyde (PAF) 4% pour inclusion en résine et analyse histo-morphométrique en microscopie optique.

Sur les stents CoCr fonctionnalisés par PDA-PM β CD seuls des résultats préliminaires après imprégnation de PTX et de simvastatine seront présentés. Des investigations plus complètes, avec notamment une analyse Western Blot sur la paroi artérielle de rat traitée par stent pour étude de la réponse cellulaire, sont en cours.

4. Partie expérimentale

4.1. Stents fonctionnalisés par immobilisation d'une molécule thérapeutique

4.1.1. Principe général de la fonctionnalisation chimique de surface

Le principe de cette partie concerne la mise au point et l'optimisation d'un protocole permettant le greffage de polymères parfaitement définis fonctionnalisés sur la chaîne latérale par des molécules thérapeutiques. Ces polymères sont générés à partir d'une ancre chimique spécifique au titane intégrant d'une part, une fonction chimique permettant de générer, de manière contrôlée, la réaction de polymérisation en présence de monomères et d'autre part, un motif chimique autorisant le greffage des polymères parfaitement définis sur les surfaces de titane (Figure 25). Cette stratégie permet ainsi de maîtriser la quantité de molécule thérapeutique immobilisée en surface (notion de posologie).

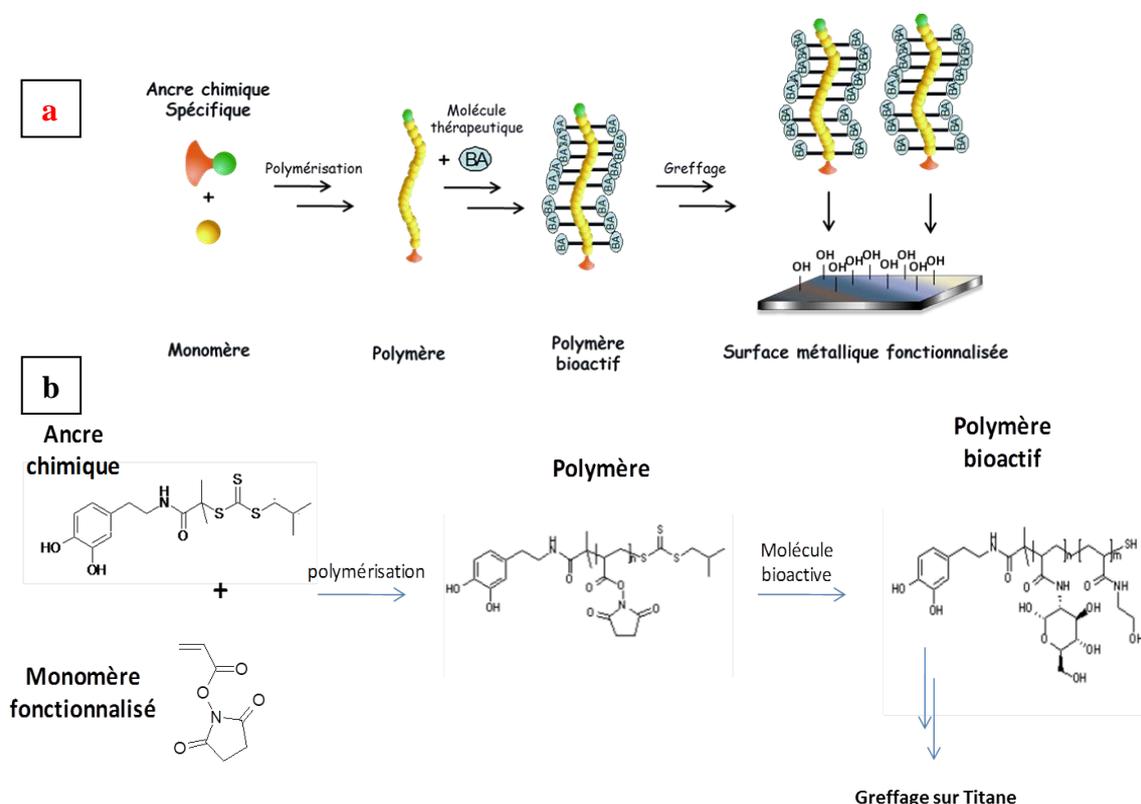


Figure 25 - Principe général schématique (a) et structurel (b) de la fonctionnalisation du titane par greffage en surface de polymères complexes fonctionnalisés par des molécules thérapeutiques

4.1.1.1. Greffage de polymères sur Titane

4.1.1.1.1. Le titane et ses alliages

4.1.1.1.1.1. Introduction

Dans le domaine de la chirurgie vasculaire, l'utilisation de stents auto-expansibles à base de NiTiNOL prédominent autant pour les revascularisations des artères périphériques²²⁸ que pour les endoprothèses aortiques^{229, 230}. Ainsi, le choix du matériau utilisé en premier intention pour mener à bien ce travail de thèse s'orientait tout naturellement vers cet alliage de titane. En effet, nous avons pu voir dans la première partie de ce travail, l'intérêt et la place qu'occupe le titane et ses alliages dans le domaine biomédical, autant pour ses caractéristiques physico-chimiques que pour son excellente biocompatibilité.

4.1.1.1.1.2. Oxydation chimique du titane

De nos jours, le titane est intensément employé en médecine dans la conception de prothèses. En effet, ce matériau possède naturellement une couche d'oxyde (TiO_2) de 3 à 7 nm d'épaisseur, qui peut être générée au contact de l'eau ou de l'air, et qui le protège de la corrosion et le rend biocompatible. Afin d'améliorer les propriétés physico-chimiques du matériau, l'épaisseur de cette couche d'oxyde ainsi que la densité de fonction hydroxyles présentes en surface peuvent être optimisées. Cette couche de dioxyde de titane peut se trouver en surface sous deux formes nanocristallines principales, le rutile et l'anatase. En fonction de la forme cristalline en surface, les matériaux à base de titane peuvent avoir des comportements différents vis-à-vis des cellules. Par exemple, le rutile présente une meilleure biocompatibilité vis-à-vis des cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 que l'anatase^{231, 232}. Toutefois, lors de l'utilisation d'un traitement oxydatif fort, comme l'emploi d'acides, il est également possible de trouver une structure amorphe de TiO_2 à la surface du titane.

Contrairement aux traitements physiques de type électrochimique ou plasma, l'oxydation chimique du titane repose sur la réaction entre la surface de la pièce de titane à traiter et un ou plusieurs composés oxydants présents en solution. Les différentes méthodes d'oxydation par voie chimique du titane peuvent être regroupées en trois catégories : acides, basiques, et traitements à base de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

4.1.1.1.1.3. Traitements acides

Les traitements acides sont fréquemment employés comme pré-traitement pour décontaminer la surface du titane et augmenter légèrement l'épaisseur du film de TiO_2 (env. 10 nm). Parmi les traitements acides, le plus employé consiste à plonger le titane dans une solution 30% HNO_3 /3% HF ^{233, 234}]. Ce dernier est efficace mais génère des fluorures de titane à la surface et peut produire une fragilisation du matériau par diffusion d'hydrogène. Ce phénomène est partiellement inhibé par l'acide nitrique mélangé en solution²³⁵. D'autres mélanges d'acides

forts peuvent être employés^{236, 237} comme par exemple, un mélange d'acide sulfurique et chlorhydrique qui permet d'oxyder et de décontaminer les surfaces de titane²³⁸.

4.1.1.1.1.4. Traitement basique

Une oxydation chimique de surface peut également être obtenue par traitement basique ; dans ce cas, le titane est traité par une solution de NaOH puis recuit. Il en résulte un film épais, poreux, qui comprend un mélange d'oxyde de titane sous forme anatase et rutile et d'une matrice de titanate de sodium, comparable en structure microporeuse²³⁹.

4.1.1.1.1.5. Traitement peroxyde

Enfin, le traitement peroxyde nécessite l'emploi combiné d'un acide fort et de H₂O₂^{234, 240, 241}. Dans un milieu acide, le peroxyde d'hydrogène réagit avec le titane pour former une couche d'oxyde amorphe. Sur des traitements de courtes durées, un film fin et poreux de TiO₂ se forme. Wang *et al.* ont montré que l'épaisseur de la couche d'oxyde dans un mélange 30% H₂O₂/HCl à 0,1 mol.l⁻¹ évolue de façon linéaire en fonction du temps²⁴⁰.

Les différentes méthodes d'oxydation évoquées ci-dessus permettent de contrôler le type d'oxyde qui se forme en surface. Cette maîtrise est primordiale car elle conditionne en général l'efficacité du greffage et la densité avec laquelle les espèces viennent s'accrocher en surface. Ainsi, dans le cadre de la fonctionnalisation de surface de titane par greffage chimique, le choix se portera sur la méthode d'oxydation qui aboutira à la formation de fonctions réactives de type hydroxyles en surface. Ainsi, c'est le traitement peroxyde à base d'H₂O₂ et de H₂SO₄ qui a été choisi.

4.1.1.1.1.6. Sites réactifs pour le greffage chimique

L'apprêtage de la surface métallique par oxydation chimique permet d'accroître le nombre et la densité de fonctions hydroxydes de surfaces nécessaires au greffage. Ainsi, pour l'application biomédicale, ces surfaces offrent de multiples possibilités d'interaction fortes entre un ligand spécifique (dite ancre chimique) et le substrat à base de titane. En effet, trois types de chélation peuvent être distingués²⁴² :

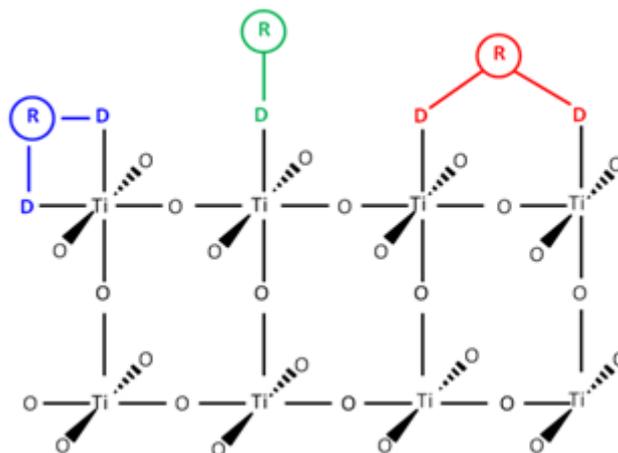


Figure 26 - Les trois types de chélation possibles sur un substrat à base de titane. R, représente la molécule se greffant et D, les ligands permettant l'accroche

- une chélation de type monodentate (Figure 26, en vert) impliquant un seul atome de titane
- une chélation de type bidentate (Figure 26, en bleu), impliquant un seul atome de titane,
- une chélation de type bidentate, conduisant à la formation d'un pont entre deux atomes de titane (Figure 26, en rouge)

4.1.1.2. Ancres chimiques pour la fonctionnalisation du titane

L'intérêt de ce travail est de fonctionnaliser de manière efficace des surfaces de titane par des polymères intégrant des molécules thérapeutiques. Ces biomatériaux étant destinés à être implantés dans un milieu biologique dynamique et complexe, la création d'interactions fortes entre les polymères et la surface devra être privilégiée. Le paragraphe suivant liste les différentes ancrs chimiques utilisées dans la littérature dans le cadre de la fonctionnalisation chimique du titane.

4.1.1.2.1.1. Les silanes

Les silanes sont des espèces couramment utilisées dans la fonctionnalisation covalente de surfaces, comme la silice²⁴³⁻²⁴⁵, les hydroxyapatites²⁴⁶, les aciers inoxydables²⁴⁷, les alliages chrome-cobalt²⁴⁸ et de titane²⁴⁹.

Dans le cas du titane, la fonctionnalisation nécessite l'emploi de dérivés de silanes intégrant des groupements labiles susceptibles de réagir avec une ou plusieurs fonctions hydroxyles.

Dans ce cadre, les trihalogéno- et alcoxysilanes ont été incontestablement les plus employés ; le choix des groupements partants est un facteur important pour l'optimisation du greffage.

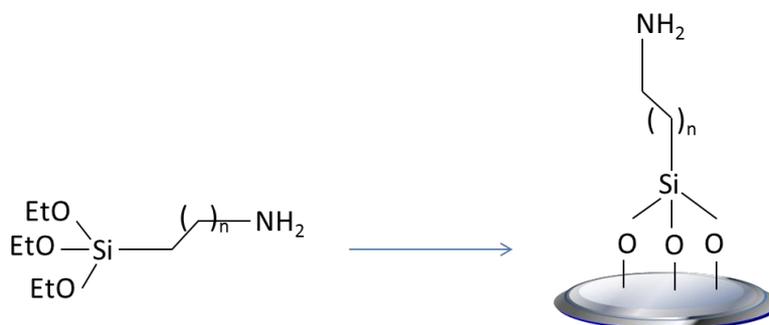


Figure 27 - exemple de silane possédant un groupement partant

En pratique, cette méthode de fonctionnalisation est très souvent utilisée pour introduire la fonction amine primaire (-NH₂) en surface par l'intermédiaire du 3-aminopropyltriéthoxysilane ce qui permet ensuite d'envisager de greffer des molécules d'intérêt biologique par des réactions de couplages (formation de liaisons peptidiques) ²⁵⁰.

Par ailleurs, des fonctions méthacrylates et des motifs vinyliques ont également pu être introduites par le biais de dérivés de silanes ²⁵¹. Ces fonctions sont alors susceptibles d'être engagées dans des processus de polymérisation radicalaire conduisant au greffage de polymère en surface. Toutefois, la fonctionnalisation des surfaces par les groupements silanes s'effectue dans des solvants anhydres (toluène, *o*-xylène) et très fréquemment à chaud ^{252, 253}. De plus, la présence d'eau engendre la polymérisation des silanes et la formation d'agglomérats conduisant à des surfaces non homogènes ^{254, 255}. Par ailleurs, les monocouches de silanes sont peu stables en milieu aqueux ²⁵⁶, et s'hydrolysent assez facilement à pH physiologique en moins d'une semaine ^{257, 258}.

4.1.1.2.1.2. Les acides carboxyliques et les dérivés d'acides phosphoniques

L'acide formique, un acide carboxylique aliphatique très court, a été très largement utilisé comme modèle pour caractériser l'adsorption sur les surfaces de titane de molécules organiques intégrant une fonction acide carboxylique ²⁵⁹. Ojamaä *et al.* ²⁶⁰ ont démontré par infrarouge que cette fonctionnalisation se faisait sous la forme de ponts bidentates. L'utilisation de la fonction acide carboxylique comme ancre chimique est très intéressante pour fonctionnaliser des substrats à base de titane, cependant la création de liaisons esters

carboxyliques hydrolysables ne permet pas d'envisager un greffage maîtrisé et durable de fonctions d'intérêt biologique en milieu aqueux et dynamique ²⁶¹.

Pour pallier à ce problème de stabilité, de nouvelles approches ont été envisagées comme le greffage d'acide phosphoniques. En effet, les acides phosphoniques et les phosphonates ont été largement employés dans les modifications de surfaces comme le Al_2O_3 ²⁶², le Fe_2O_3 ²⁶³, le TiO_2 ^{264, 265} ou encore l'acier 316L ²⁶⁶. Les dérivés phosphoniques se greffent sur l'oxyde de titane par réaction de déshydratation. Leur greffage s'effectue par simple immersion de la pièce à fonctionnaliser dans la solution d'acide phosphonique. Cette méthode fonctionne par ailleurs aussi bien dans les solvants organiques ²⁶⁷ que aqueux ²⁶⁸ et permet d'introduire en surface des fonctions réactives telles que des groupes hydroxyles ²⁶⁹, mais aussi des acides carboxyliques ²⁷⁰ des alcools et des alcènes ²⁷¹ (Figure 28). Ces fonctions peuvent être ensuite exploitées pour modifier chimiquement les propriétés des surfaces de titane (=post-fonctionnalisation).

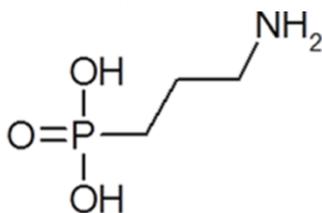


Figure 28 - Structure d'un acide phosphonique couramment employé pour la modification de surface de titane : le 3-aminopropylphosphonique

Néanmoins, l'utilisation d'acides phosphoniques présentent quelques inconvénients. Une fonctionnalisation optimale de la surface du titane à l'aide d'esters phosphoniques nécessite des températures supérieures à 100°C, rendant ainsi caduque le greffage direct de molécules biologiques sensibles à la température comme par exemples des polypeptides ou encore des molécules à base de sucres. Par ailleurs, la préparation des ancres de ce type implique dans la plupart des cas de mettre en œuvre des stratégies multi-étapes comportant des étapes de protection et de déprotection ^{269, 272} trop lourdes.

4.1.1.2.1.3. Les catéchols

Les catéchols (1,2-dihydroxybenzène) sont des motifs que l'on retrouve dans certaines molécules naturelles synthétisées par des organismes vivants, le plus souvent par modification de la phénylalanine ^{273, 274}. Les protéines adhésives sécrétées par les moules marinières (MAP) quant à elles (Figure 29) sont très riches en motifs catéchols, ce qui leur permet d'adhérer très efficacement aux surfaces céramiques, métalliques, comme l'acier, l'or, le titane ²⁷⁵ et certains polymères comme le PTFE ^{276, 277}.

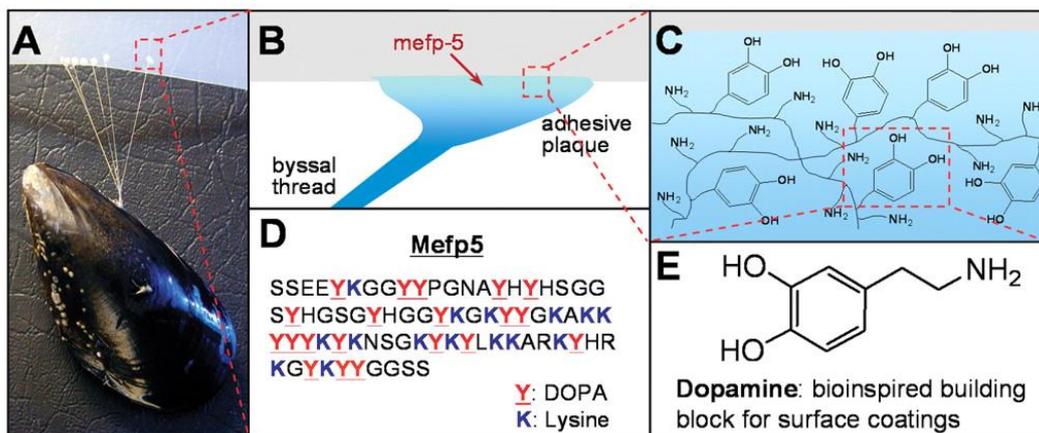


Figure 29 - La protéine mefp5 (B), responsable des propriétés adhésives des byssus des moules marinières (A) ont une concentration élevée en fonctions catéchols (C, D). Représentation de la dopamine (E) (d'après H.Lee, Science 2007²⁷⁶)

La force de la liaison entre le motif catéchol et la surface a été évaluée par AFM à 805 ± 131 pN, témoigne de la robustesse du greffage²⁷⁸ (Figure 30). A titre comparatif, la rupture d'une liaison covalente Si-C nécessite une force de $2,0 \pm 0,3$ nN²⁷⁹.

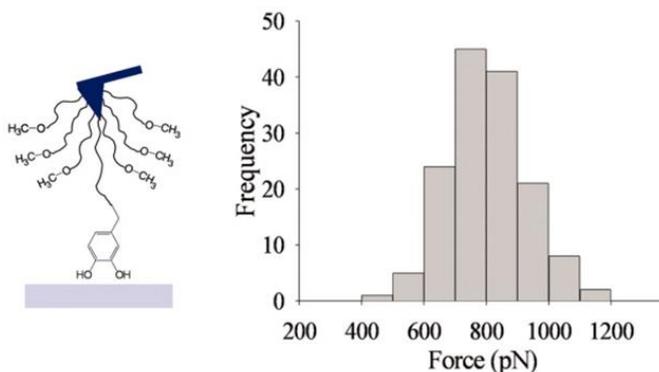


Figure 30 – Evaluation par AFM de la force nécessaire pour arracher un motif catéchol greffé sur une surface de titane (d'après Oesterhelt, 1999²⁷⁹)

Par ailleurs, des études récentes²⁸⁰ ont montré que le motif catéchol est susceptible de s'adsorber sur le titane (Figure 31, a et c) par chélation et/ou d'interagir très fortement avec la surface par le biais d'interactions de type liaisons hydrogène (Figure 31, b).

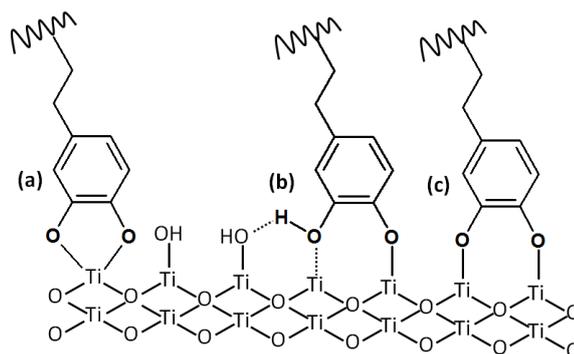


Figure 31 - Représentation des différents modes d'adhésion des catéchols sur le titane : chélation bidentate (a), chélation monodentate avec liaison hydrogène (b), pont bidentate (c).

Les liaisons ainsi formées par les catéchols à la surface du titane sont stables en milieu aqueux, pour des pH compris entre 3 et 10, avec un maximum d'absorption entre pH 6 et 8²⁸¹. Au-delà de pH 10, l'unité catéchol s'oxyde en quinone et perd ses propriétés d'adhésion²⁷⁸. Par ailleurs, l'électroactivité du motif catéchol peut être exploitée afin de démontrer le greffage de cette molécule à la surface du titane, le substrat fonctionnalisé jouant ici le rôle d'électrode de travail (Figure 32). De plus, par intégration du courant d'électrolyse, la densité de greffage peut également être estimée^{282, 283}.

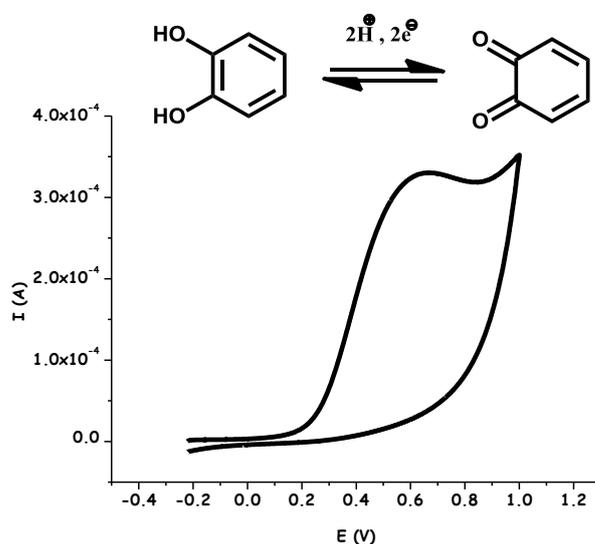


Figure 32 - Voltampérogramme d'un échantillon de titane modifié par la dopamine. Conditions : Tampon phosphate pH=7, $v=50\text{mV/s}$ vs Ag/AgCl

Parmi les différentes molécules intégrant le motif catéchol, la dopamine est celle qui présente le plus grand potentiel. En effet, elle est biocompatible, commercialisée sous une forme

« prêt-à-l'emploi » et surtout possède une fonction amine primaire nucléophile libre susceptible d'être modifiée de manière simple par un groupement fonctionnel.

Certains dérivés de la dopamine offrent la possibilité de générer des polymères parfaitement définis en utilisant les techniques de polymérisation radicalaires contrôlées. Le paragraphe suivant décrit les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée les plus fréquemment employées en particulier la polymérisation de type RAFT (Reversible Addition-Fragmentation chain Transfert).

4.1.1.3. Greffage de brosse de polymère sur le titane

4.1.1.3.1. Introduction

Le greffage de brosses de polymères ²⁸⁴ sur surfaces est une technique de greffage couramment employée pour modifier les propriétés physico-chimiques des biomatériaux telles que l'hydrophobicité, l'adhésion cellulaire ou encore la résistance à la corrosion ^{285, 286}. Les techniques de polymérisation radicalaire contrôlée sont alors largement employées dans de multiples domaines tels que l'électronique ²⁸⁷⁻²⁸⁹ et particulièrement le domaine biomédical pour améliorer les performances des biomatériaux ²⁹⁰.

Pour se faire, deux stratégies différentes sont employées ²⁹¹ (Figure 33) :

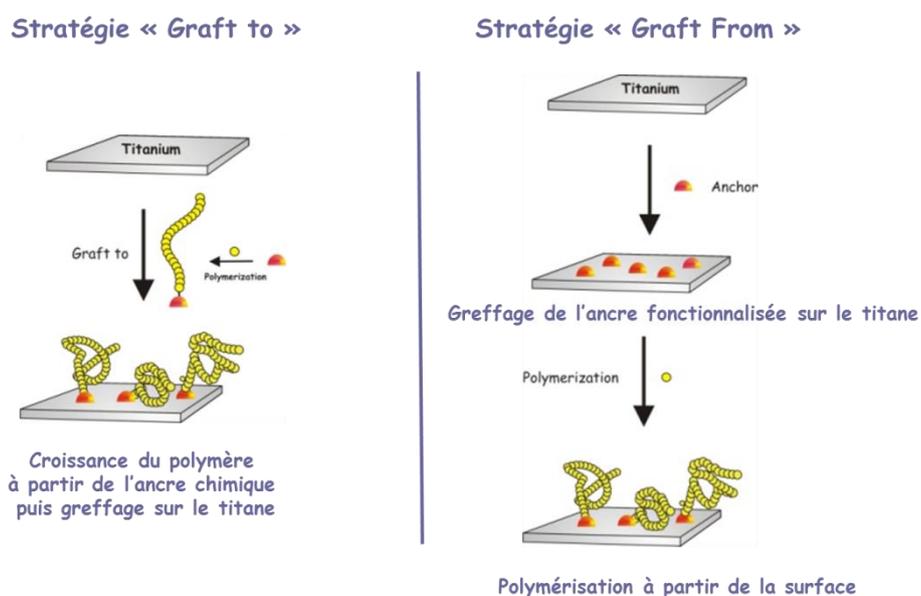


Figure 33 - Elaboration de polymères brosses au moyen de la stratégie « graft to » par greffage direct (a) ou en deux étapes par la stratégie du « graft from » (b)

✓ la première stratégie consiste à synthétiser un polymère parfaitement défini possédant en extrémité de chaîne une ancre chimique spécifique, puis de venir le greffer en surface. Cette stratégie, appelée stratégie « graft to », permet une fonctionnalisation directe du biomatériau en une seule étape.

✓ la seconde stratégie implique l'élaboration du polymère à partir de la surface à l'aide d'une ancre chimique spécifique préalablement immobilisée. Cette stratégie de fonctionnalisation appelée stratégie « graft from » implique donc 2 étapes.

La stratégie « graft from » possède l'avantage de générer des films de polymères denses et de recouvrir l'intégralité de la surface en polymères²⁸⁵. Toutefois, les polymères immobilisés en surface sont difficiles à caractériser et il n'est pas possible d'immobiliser plusieurs polymères de nature différente en une seule étape²⁹².

L'atout majeur de la stratégie « graft to », repose sur la maîtrise des paramètres macromoléculaires des polymères, c'est-à-dire, la composition chimique, la masse molaire en nombre, l'indice de polymolécularité (\bar{M}_w),... et il devient alors envisageable d'élaborer des surfaces mixtes à partir de polymères de natures différentes²⁹³. Compte tenu du contexte de ce travail où la nature du revêtement polymère doit être parfaitement maîtrisée, c'est tout naturellement que nous nous sommes dirigés vers la combinaison de la stratégie « graft to » et de la polymérisation radicalaire contrôlée (PRC) pour la suite de ce travail.

4.1.1.3.2. Principe de la PRC

Plusieurs techniques de polymérisation permettent d'accéder à des polymères parfaitement définis. Parmi celles-ci, on peut citer les polymérisations anionique²⁹⁴, cationique^{295, 296}, par ouverture de cycle²⁹⁷ (ROMP : ring opening metathesis polymerization) et les polymérisations radicalaires contrôlées (ATRP, NMP, RAFT, etc)²⁹⁸. Si les deux premières méthodes précitées permettent effectivement d'accéder à des polymères parfaitement définis, la haute réactivité des espèces actives ne permet pas d'envisager l'incorporation directe d'unités dites « sensibles » comme par exemple des unités glucosidiques ou des esters activés au sein d'une chaîne polymère.

La PRC, quant à elle, consiste à insérer une étape réactionnelle dans le processus de polymérisation radicalaire classique. Ce peut être soit une réaction de terminaison réversible reposant sur une réaction d'activation et de désactivation des chaînes en croissance comme c'est le cas pour l'ATRP (Polymérisation Radicalaire par Transfert d'Atome), soit une

réaction de transfert réversible fondée sur un équilibre d'addition et de fragmentation, comme c'est le cas pour la polymérisation de type RAFT (polymérisation par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation)^{299, 300}.

De plus, pour qu'une polymérisation radicalaire puisse être considérée comme contrôlée, il faut qu'elle remplisse les critères suivants :

- ✓ l'incorporation des unités de monomère dans la chaîne polymère suit une cinétique d'ordre 1
- ✓ la masse molaire moyenne en nombre (M_n) expérimentale est proche du M_n théorique
- ✓ l'indice de polymolécularité (\bar{D}) doit être proche de 1

Pour que cela soit possible, il faut que

- ✓ la vitesse d'amorçage soit élevée devant celle de propagation permettant ainsi la croissance uniforme de toutes les chaînes
- ✓ les réactions de transferts et de terminaisons irréversibles soient quasi-inexistantes.

En ATRP, le contrôle de la réaction de polymérisation résulte de l'emploi d'un catalyseur à base de cuivre qui fournit un équilibre entre formes actives et dormantes des chaînes en croissance limitant ainsi les réactions secondaires. Toutefois, cette technique s'est avérée incompatible avec la pince catéchol chélatante du motif dopamine et des traces de cuivre sont souvent observées dans les polymères résultants ce qui est incompatible avec notre objectif³⁰¹. Ainsi, la méthode retenue dans le cadre de nos travaux s'est rapidement portée vers la polymérisation de type RAFT, car elle permet de polymériser une large gamme de monomères dans des conditions douces sans utiliser de catalyseur. Le paragraphe suivant permettra de se familiariser avec le procédé de la polymérisation de type RAFT.

4.1.1.3.3. Polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT

Le processus de polymérisation radicalaire contrôlée par transfert de chaîne réversible par addition-fragmentation (RAFT) est l'une des techniques les plus récentes de polymérisation radicalaire contrôlée. Il s'appuie sur un processus réversible de dégénérescence^{299, 300, 302} des chaînes par fragmentation afin d'assurer le contrôle de la polymérisation. Le mécanisme réactionnel de la polymérisation est décrit dans la Figure 34.

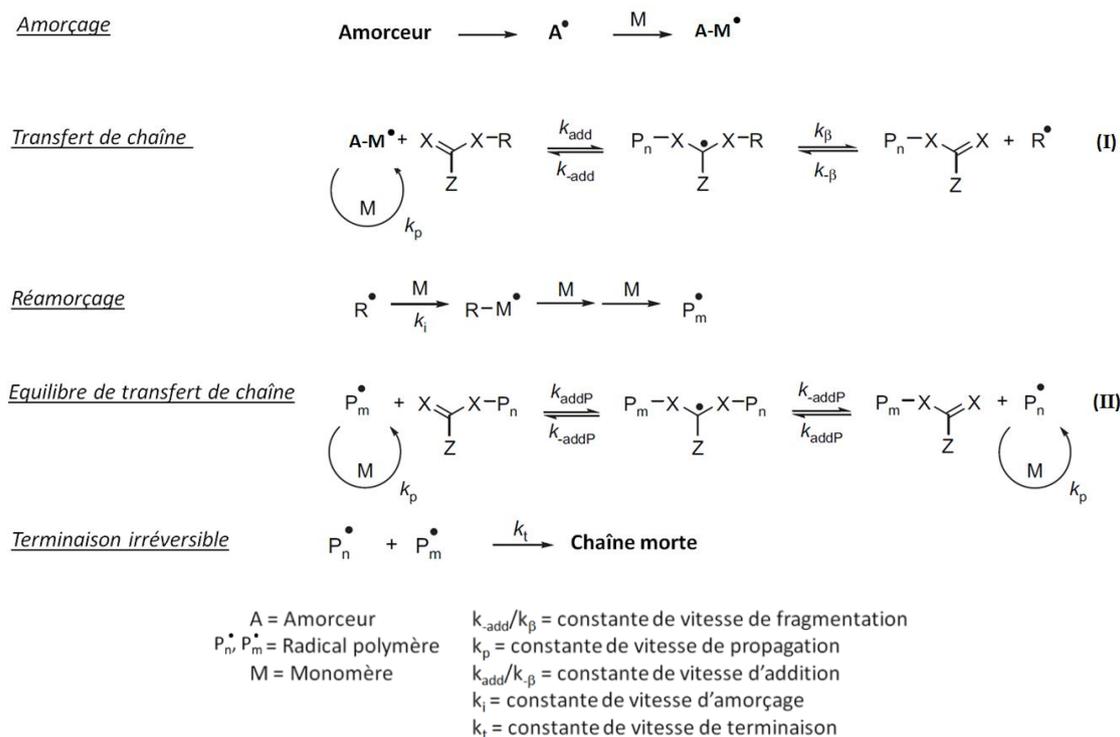


Figure 34 - Mécanisme de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT

Après décomposition de l'amorceur (ici AIBN=azobisisobutyronitrile), la première espèce radicalaire générée s'additionne sur le monomère pour donner naissance au radical carboné dérivé du monomère A-M°. Ce radical réagit ensuite rapidement avec l'agent de transfert pour conduire à la formation de l'entité radicalaire correspondante (non active vis-à-vis du processus de polymérisation) qui se fragmente pour donner un macro-amorceur et un radical R• capable de réamorcer une polymérisation. Cette étape réactionnelle dite d'activation permettra d'ajouter au moins un monomère au radical R• pour former une chaîne Pm•. Pour obtenir un polymère possédant une faible distribution statistique, il faut que la durée de l'étape d'activation soit la plus courte possible.

Au cours de l'étape d'équilibre de transfert de chaîne par addition-fragmentation, un système en équilibre se forme entre les chaînes propageantes et un intermédiaire radicalaire constitué de l'agent de transfert et deux chaînes dormantes. Par dégénérescence, cet intermédiaire se fragmente et les groupes terminaux (des chaînes polymères) sont libérés. Ces groupes libres vont, soit s'additionner à nouveau sur un agent de transfert pour redevenir une chaîne dormante, soit réagir avec un monomère, allongeant ainsi la chaîne polymère. La vitesse de transfert entre chaîne propageante et chaîne dormante est suffisamment élevée pour permettre une addition équiprobable de monomère entre toutes les chaînes.

Comme toute polymérisation dite « vivante », la polymérisation RAFT minimise les réactions de terminaison irréversible en limitant le nombre de radicaux présents simultanément dans le milieu réactionnel. Il arrive cependant qu'une réaction de terminaison irréversible se produise entre deux espèces actives par couplage radicalaire ou par dismutation. Le taux de ces réactions de terminaison est directement lié à la concentration en amorceur. Dans le cas des polymérisations RAFT, le rapport entre la concentration initiale en amorceur et la concentration initiale en agent de transfert doit être suffisamment bas pour que le taux de terminaisons n'exécède pas 5%.

L'atout majeur de la polymérisation RAFT est lié à la grande variété d'agents de transfert disponibles ou facilement synthétisables. Ainsi, en choisissant judicieusement l'agent de transfert, il est possible de polymériser de manière contrôlée une très large gamme de monomères «classiques» (styréniques, acrylates, acrylamides, acétate de vinyle,...) mais également activés (*N*-acryloyloxysuccinimide (NAS))^{303, 304} ou incorporant des unités bioactives (peptides, polysaccharides)³⁰⁵, avec des indices de polymolécularité (\bar{D}) faibles.

Les agents de transfert les plus utilisés appartiennent à la famille des «thiocarbonylthio». Notre choix s'est porté sur le groupement trithiocarbonate (Figure 35)³⁰⁶, car l'équipe de Davis³⁰⁷ a récemment montré l'absence de cytotoxicité des polymères synthétisés par polymérisation RAFT à partir de ce type d'agent de transfert.

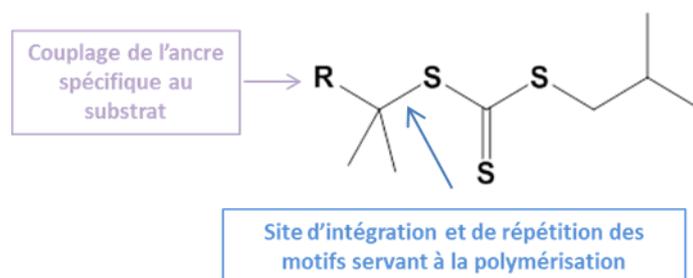


Figure 35 - Agent de transfert de type trithiocarbonate

Le groupe R, constitutif du motif trithiocarbonate, doit être un bon groupe partant et il doit être également capable d'amorcer efficacement la polymérisation³⁰⁸.

Nous proposerons donc au cours de ce chapitre, la synthèse et la caractérisation de polymères parfaitement définis préparés par polymérisation RAFT et intégrant sur sa chaîne latérale des groupements fonctionnels conduisant au greffage de molécules d'intérêt thérapeutique. Ces polymères intégreront également en bout de chaîne un motif de type catéchol autorisant le

greffage du polymère fonctionnel sur la surface de titane³⁰⁹ en utilisant la stratégie « graft to ».

4.1.2. Résultats et discussion

L'objectif du travail est de concevoir une plateforme à base de polymère parfaitement définie et facilement post-fonctionnalisable par des molécules d'intérêt biologique. Dans cette optique, nous avons opté pour une plateforme polymère préparée par RAFT et intégrant des fonctions esters activés de type *N*-hydroxysuccinimide qui présentent l'avantage d'être facilement déplacées de manière spécifique par des composés aminés.

4.1.2.1. Synthèse de l'agent de transfert dopamine-RAFT

Comme évoqué précédemment, l'un des nombreux avantages de la dopamine est de pouvoir être modifiée chimiquement en exploitant la nucléophilie de sa fonction amine primaire. Ainsi, une ancre chimique à base de dopamine et intégrant un groupement trithiocarbonate (agent de transfert RAFT) a pu être synthétisée. Celle-ci est obtenue par réaction de la dopamine avec un ester activé intégrant le motif trithiocarbonate, synthétisé précédemment au Laboratoire UMET.

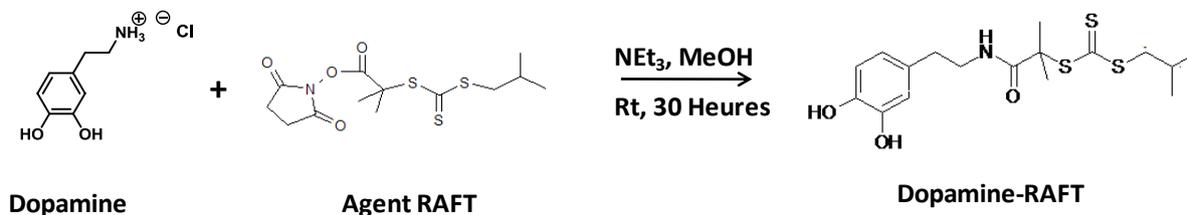


Figure 36 - Synthèse de la dopamine-RAFT

L'analyse RMN du ¹H (et ¹³C) a été utilisée afin de confirmer la structure de l'agent de transfert synthétisé intégrant l'ancre dopamine.

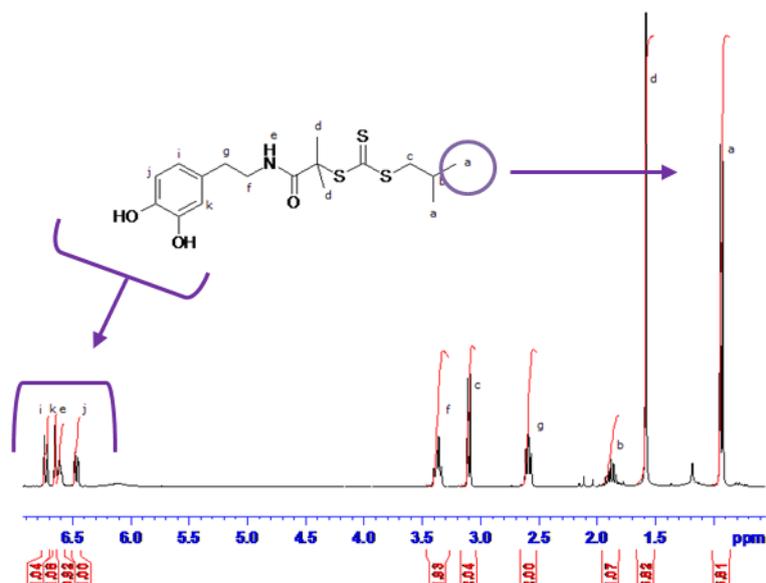


Figure 37 - Spectre RMN-1H de l'ancre dopamine-RAFT

On observe sur le spectre RMN-¹H (Figure 37) de la dopamine-RAFT, les protons caractéristiques de la dopamine entre 6 et 7 ppm correspondant aux protons aromatiques et phénols caractéristiques de la dopamine (i, j et k). D'autre part, on observe très distinctement les protons caractéristiques des méthyles (a et d) portés par le fragment trithiocarbonate à 0,9 et 1,6 ppm. A noter que l'intégration de chaque signal correspond au nombre de protons attendu en accord avec la structure chimique de la molécule synthétisée.

Par ailleurs, afin d'évaluer l'impact du motif catéchol i) sur la réaction de polymérisation ii) sur la cytotoxicité des polymères et iii) sur le greffage des polymères sur titane, un agent de transfert contenant un groupement benzyl- à la place du motif catéchol (Benzyl-RAFT) a également été synthétisé selon le même schéma réactionnel à partir de l'alcool benzylique (mode opératoire et caractérisations RMN précédemment exposés).

4.1.2.2. Synthèse des Polymères d'esters activés (pNAS) à partir de la dopamine-RAFT et du Benzyl-RAFT

*Synthèse du monomère NAS

Le monomère de *N*-acryloylsuccinimide (NAS) est un ester activé qui possède un bon groupement partant qui peut être facilement déplacé par une molécule contenant une fonction amine réactive. Le schéma de synthèse du monomère NAS est repris dans la Figure 38.

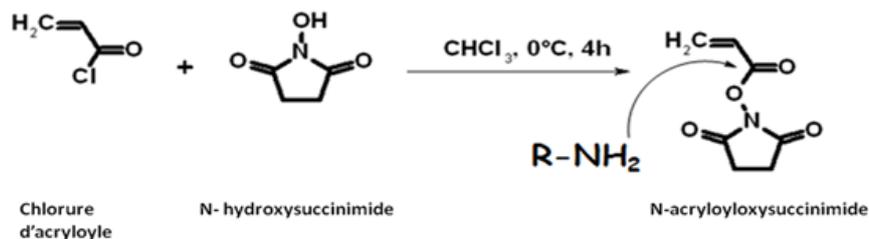


Figure 38 - schéma de synthèse du monomère NAS

Celui-ci est obtenu très facilement par réaction du *N*-hydroxysuccinimide avec le chlorure d'acryloyle³¹⁰. Une fois obtenu, le monomère de NAS peut être engagé dans une réaction de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT en présence d'agent de transfert dopamine-RAFT ou benzyl-RAFT.

* *Polymérisation du NAS en présence des agents de transfert dopamine-RAFT et benzyl-RAFT*

Les paramètres choisis pour le suivi cinétique de polymérisation du NAS en présence des agents de transfert RAFT sont répertoriés dans Figure 39.

Monomère	Solvant	T (°C)	$[M]_0/[CTA]_0/[A]_0$	Monomère/Solvant (%v)	Non-Solvant
NAS	DMF	75	100 ou 50/1/0,05	15/85	Méthanol

Figure 39 - Paramètres utilisés pour la polymérisation RAFT du monomère NAS en présence des agents de transfert RAFT; $[M]_0$, $[RAFT]_0$, $[A]_0$: concentration initiale respectivement du monomère, de l'agent de transfert et de l'amorceur. Le rapport Monomère/Solvant est exprimé en pourcentage

L'étude de la cinétique de polymérisation permet de déterminer les conditions optimales pour obtenir les polymères de longueurs désirées avec le meilleur rendement possible. Pour se faire, nous avons étudié la réaction de polymérisation en fonction du temps et avec des concentrations en réactifs définies (fixes) (annexe 2).

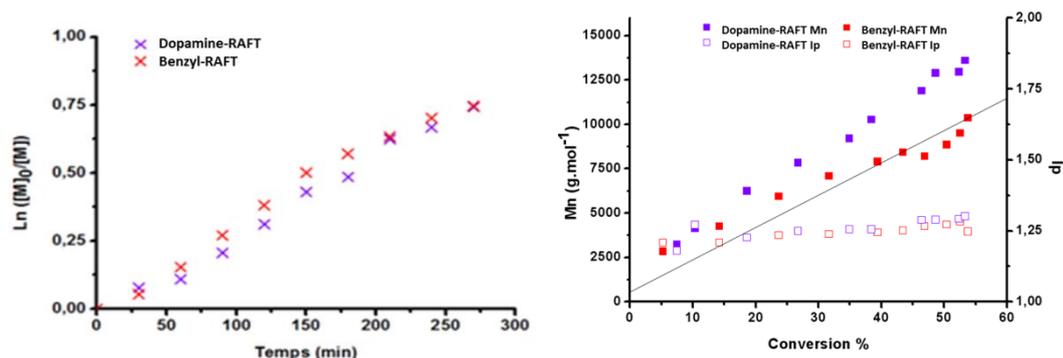
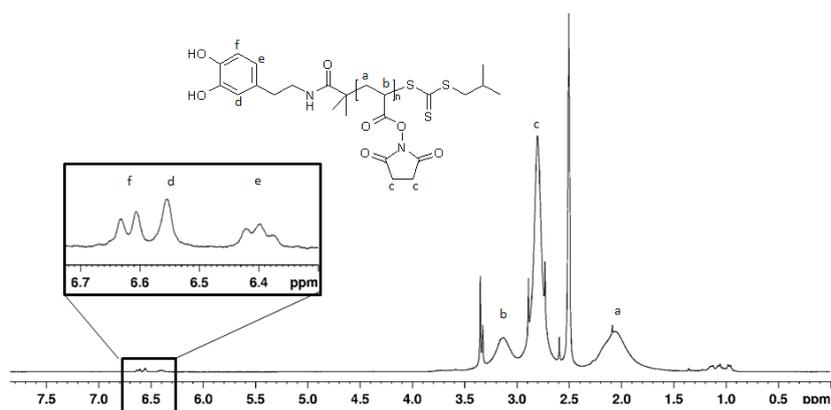


Figure 40 - Cinétique de polymérisation RAFT du NAS à partir des 2 agents de transfert RAFT (dopamine-RAFT et benzyl-RAFT). (a) Evolution de la conversion en fonction du temps. (b) Evolution de la masse molaire M_n et de l'indice de polymolécularité en fonction du taux de conversion

Le suivi cinétique de la polymérisation du NAS en présence des 2 agents de transfert démontre une croissance linéaire du $\ln([M_0]/[M])$ en fonction du temps, indiquant une concentration en radicaux constante lors des polymérisations RAFT (Figure 40a). En outre, les vitesses de polymérisation sont similaires en employant les 2 agents de transfert. Le groupe terminal, benzyle ou catéchol, de l'agent de transfert n'a donc ici aucune influence sur la vitesse de polymérisation.

L'évolution des masses molaires M_n et des indices de polymolécularité \bar{D} en fonction de la conversion est représentée sur la Figure 40b. Les masses molaires M_n croissent de façon linéaire avec la conversion et suivent la pente de la droite théorique de conversion (ligne sur le graphe Figure 40b). Par ailleurs, les indices \bar{D} demeurent inférieurs à 1,3 tout au long de la polymérisation. Les agents de transfert employés permettent donc de contrôler la polymérisation du NAS. Les polymères, précipités et séchés, ont été caractérisés par RMN ^1H (Figure 40).



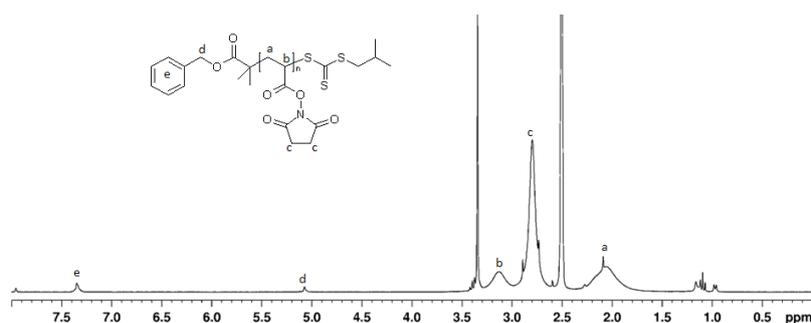


Figure 41 - Spectres RMN-¹H des polymères dopamine-pNAS (a) et benzyl-pNAS (b) (Solvant DMSO)

Le spectre RMN ¹H confirme la présence de l'ancre catéchol ($\delta = 6,35-6,70$ ppm) en extrémité de chaîne pour le **Dopamine-PNAS** (Figure 41a), et le groupe benzyle ($\delta = 7,35$ ppm) pour le **benzyle-PNAS** (Figure 41b). La présence de groupements *N*-hydroxysuccinimide (NHS) sur la chaîne polymère est révélée par le pic à 2,8 ppm ce qui montre que l'intégralité des fonctions NHS a été préservée lors de la polymérisation (intégration des signaux RMN-¹H concordante). La comparaison des intégrales relatives aux signaux des protons H_d, H_e, H_f portés par le motif catéchol à celle des protons H_b localisés sur la chaîne principale, nous a permis de calculer la longueur des chaînes selon l'Équation 1 :

$$Dp = \frac{3I_{H_b}}{2(I_{H_d} + I_{H_e} + I_{H_f})} \quad Dp = \frac{5I_{H_b}}{2(I_{H_e})}$$

Équation 1 – détermination du nombre d'unité de répétition pour le **dopamine-pNAS** (a) et le **benzyle-pNAS** (b)

Où I_n représente l'intégration des pics correspondant aux protons H_a, H_d, H_e et H_f (Figure 41a). Les DP_n, ont été ainsi estimés à 98 (dopamine-pNAS, Mn_{RMN} = 17 000 g.mol⁻¹) et 79 (benzyl-pNAS, Mn_{RMN} = 13 700 g.mol⁻¹) unités de répétition sur cet exemple.

4.1.2.3. Post-fonctionnalisation des polymères de pNAS par la glucosamine

4.1.2.3.1. Choix de la glucosamine

La glucosamine (Figure 42) est un précurseur de la synthèse des glycosaminoglycans, protéoglycans constituant de la paroi endothéliale et participe à la glycosylation des protéines³¹¹.

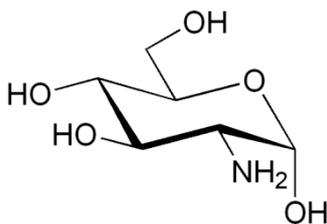


Figure 42 - Structure chimique de la Glucosamine

Dans la cellule, la glucosamine est produite à partir du glucose par la voie de l'hexosamine, qui nécessite du Fructose-6-phosphate et de la glutamine. Cette réaction est catalysée par la glutamine-fructose-6-phosphate-aminotransférase. 1 à 2% du glucose de l'organisme est consommé dans cette voie ^{312, 313}. Bien que les cellules peuvent synthétiser leur propre glucosamine, la glucosamine d'origine exogène est intégrée à la cellule et est convertie en dérivé 6-phosphate, qui participe à la synthèse de l'héparane-sulfate protéoglycane (HSPG, encore appelé perlecan). Le glucose et la glucosamine semblent avoir des effets opposés sur les protéoglycanes et la prolifération des cellules de la paroi vasculaire. De récentes études ont en effet montré que la glucosamine, contrairement au glucose, favorisait la prolifération des cellules endothéliales et diminuait la synthèse des cellules musculaires lisses endothéliales (Figure 43) ³¹⁴.

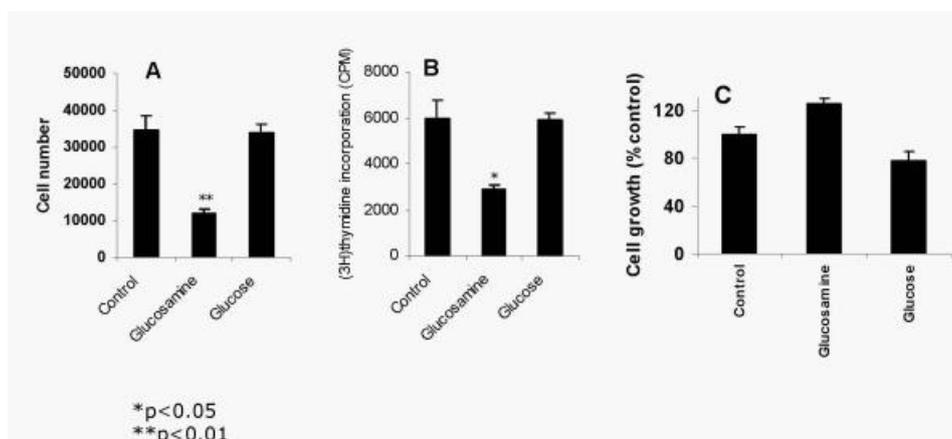


Figure 43 - Effets de la glucosamine et du glucose sur les cellules musculaires lisses endothéliales (a et b) et les cellules endothéliales (c) (d'après Duan W ³¹⁴)

D'un point de vue pratique, la glucosamine est une molécule peu coûteuse, commercialisée sous la forme ammonium, intégrant une fonction amine réactive, et facilement accessible. Au final, son rôle au sein de la paroi vasculaire et sa potentielle influence dans la régulation de la cicatrisation endothéliale en font une molécule de choix pour notre modèle expérimental.

4.1.2.3.2. Post-fonctionnalisation des polymères de NAS

Les études cinétiques précédentes montrent qu'il est possible d'élaborer des polymères d'esters activés de longueur contrôlée et possédant des indices de polymolécularité proche de 1. La polymérisation par le procédé RAFT a donc permis de préparer à partir des 2 agents de transfert des polymères possédant 50 unités ($M_{n,RMN} = 8\,800 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D} = 1,15$) et 100 unités NAS ($M_{n,RMN} = 16\,500 \text{ g.mol}^{-1}$, $\mathcal{D} = 1,25$). Ces deux polymères d'esters activés seront utilisés dans la suite de l'étude afin d'accéder à une large gamme de copolymères inédits comportant une quantité variable d'unités glucosidiques (glucosamines) et d'étudier l'influence de la longueur de chaîne sur l'activité biologique.

Notre stratégie a consisté à insérer dans un premier temps des unités de glucosamine en quantité connue sur la charpente polymère (réaction quantitative), puis à déplacer les fonctions activées restantes par l'éthanolamine qui est non toxique ³¹⁵.

Ces deux étapes de post-fonctionnalisation, ont dû être optimisées afin d'éviter d'éventuelles réactions secondaires, comme la réaction de Maillard, et pour préserver la fonction trithiocarbonate localisée en extrémité de chaîne. Les conditions optimales sont reportées sur la flèche de réaction de la Figure 44.

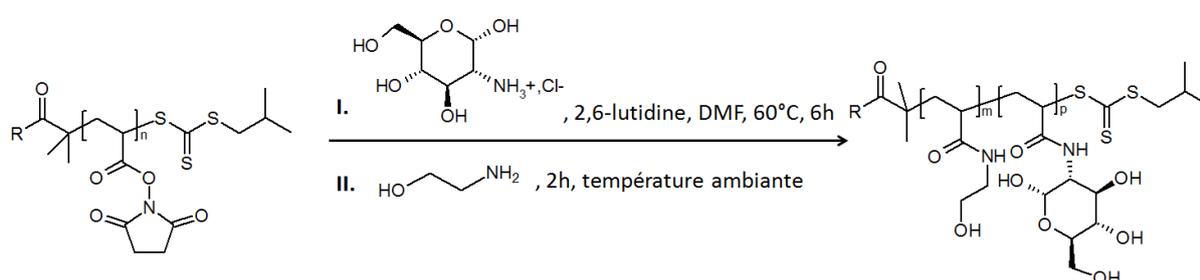


Figure 44 - Principe de la post-fonctionnalisation des polymères PNAS par la glucosamine et l'éthanolamine

A partir des différents Dopamine-pNAS ($DP_n=50$ et 100) et benzyl-pNAS ($DP_n=50$ et 100), 12 copolymères de type poly(*N*-glucosacrylamide)-co-(*N*-(2-hydroxyéthyl)acrylamide) ont pu être conçus contenant respectivement 10, 20 et 40% molaire de glucosamine. Afin de distinguer ces polymères, la nomenclature suivante a été employée : nom du polymère = agent de transfert + pNGlu + nombre d'unités + pourcentage de glucosamine. Ainsi, un polymère de 100 unités avec 20% de glucosamine formé à partir d'un dopamine-pNAS sera décrit comme suit : dopamine-pNGlu 100u – 20%. Par souci de clarté, seuls les résultats et les analyses physicochimiques réalisées sur le dopamine-pNGlu 100u – 40% seront présentées ici. Les données concernant les autres copolymères ont été regroupées en annexe 3.

Les deux réactions de post-fonctionnalisation ont été réalisées en « one pot » sans étape de purification intermédiaire³¹⁰. Pour cela, une quantité choisie de glucosamine est introduite puis, un excès d'éthanolamine est injecté dans le milieu pour réagir avec les fonctions succinimides restantes. Les polymères sont ensuite précipités dans l'acétone et séchés.

Sur le spectre RMN ¹H de la glucosamine (Figure 45, spectre vert) apparaissent les protons des deux anomères α (H_a) et β (H_b) du chlorhydrate de glucosamine. L'attribution des signaux des protons de la glucosamine a été faite d'après la littérature³¹⁶. Les protons du motif hémiacétal sous forme α et β sont détectés respectivement à $H_a = 5,3$ ppm et $H_b = 4,8$ ppm. Le spectre RMN ¹H du polymère après les deux étapes de post-fonctionnalisation est représenté en bleu (Figure 45).

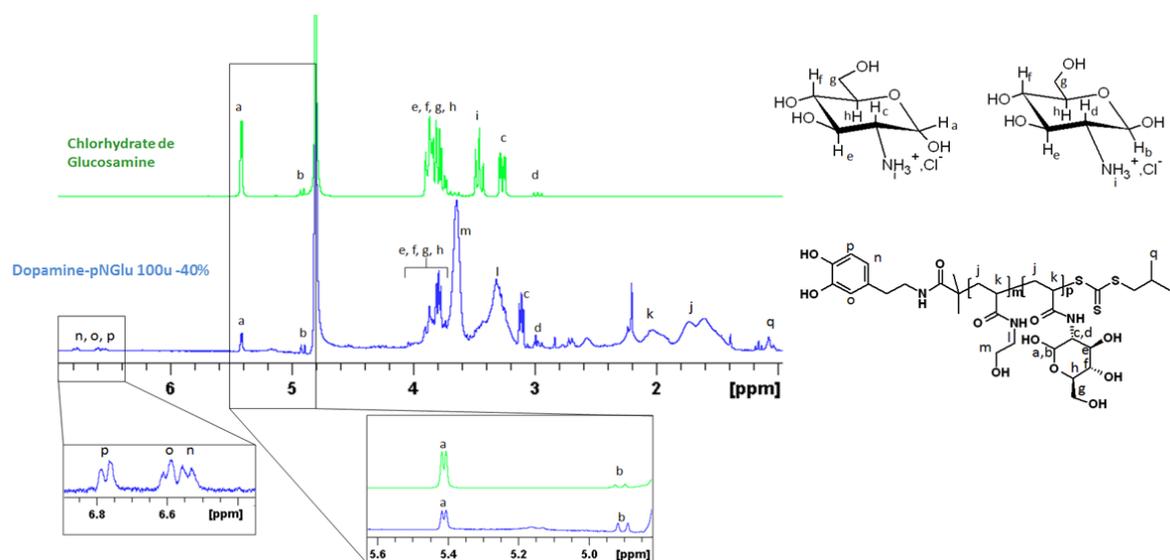


Figure 45 - Spectres RMN ¹H de chlorhydrate de glucosamine (vert), et des polymères de dopamine-pNGlu 100u-40% (bleu)

Sur le spectre RMN ¹H du polymère post-fonctionnalisé, les pics correspondant aux protons du squelette polymère H_j et H_k sont identifiés respectivement à $\delta = 1,2-1,75$ ppm et $\delta = 1,75-2,2$ ppm. De même, les protons H_l et H_m situés respectivement en α et β de l'atome d'azote des fonctions amides générées lors de la seconde étape résonnent sur les spectres RMN ¹H à $\delta = 4,52$ ppm et $\delta = 3,19$ ppm. Il est à noter que le pic caractéristique de la fonction succinimide à $\delta = 2,8$ ppm a entièrement disparu, témoignant ainsi de l'efficacité du couplage envisagé. Par ailleurs, les spectres montrent très clairement la présence des protons H_e , H_f , H_g et H_h ($\delta = 3,6-3,85$ ppm) caractéristiques du motif glucosidique.

Concernant les extrémités de chaînes, le spectre RMN du copolymère permet de distinguer les protons H_n , H_o , H_p entre 6,0-6,5 ppm portés par l'unité catéchol (Figure 45, insert) ainsi que

les protons H_q centrés sur 0,89 ppm du fragment isobutyle de l'agent de transfert. Par ailleurs, l'intégration de ces signaux (rapport $H_q/H_{n,o,p}=2$) montre très clairement que les différents traitements chimiques permettent de préserver la fonction trithiocarbonate localisée en extrémité de chaîne. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite réalisé une étude par spectroscopie UV-visible (Figure 46).

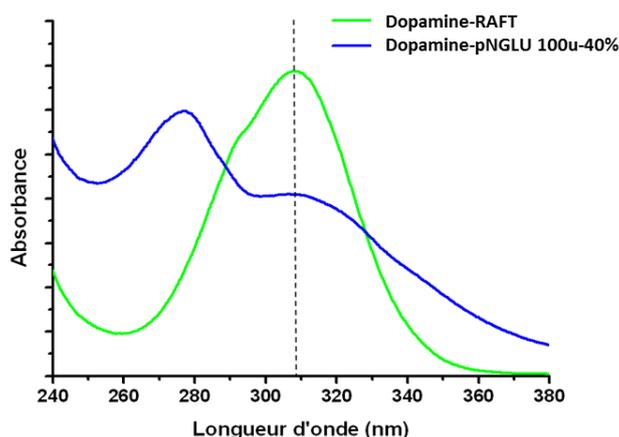


Figure 46 - Spectroscopie UV du dopamine-pNGLu 100u – 40% (bleu), et de l'agent de transfert dopamine-RAFT (vert) $C = 1.10^{-4} \text{ mol.l}^{-1}$

La présence du groupement trithiocarbonate en fin de traitement est confirmée pour le polymère traité à l'éthanolamine à température ambiante au travers de l'existence de la bande d'absorption caractéristique de la fonction trithiocarbonate centrée sur 310 nm (Figure 46).

Dans le cadre des évaluations biologiques, 4 polymères pNAS ont été synthétisés avec des longueurs de chaîne de 50 et 100 unités et incorporant en extrémité de chaîne soit un fragment catéchol, soit un fragment benzyle. Chacun de ces polymères a été ensuite post-fonctionnalisé en intégrant trois taux de glucosamine différents (10, 20 et 40%) (Figure 47). Leur synthèse a été caractérisée en RMN- ^1H (annexe 3).

Ces premiers résultats ouvrent des perspectives intéressantes et devraient notamment permettre d'incorporer ultérieurement des molécules plus complexes comme des glycosaminoglycans, composant la matrice extracellulaire ou des peptides.



Figure 47 - Polymères de Dopamine-pNAS-100 unités fonctionnalisés par 10, 20 et 40% de glucosamine

4.1.2.4. Greffages des polymères de glucosamine sur la surface du titane

4.1.2.4.1. Oxydation des surfaces de titane

Dans un premier temps, l'influence du traitement oxydant sur l'état des surfaces de titane a été suivie par microscopie optique. La Figure 48 rassemble une succession de clichés enregistrés à l'aide d'un microscope optique (zoom 20x) de pastilles de titane polies miroir après différents temps d'immersion dans la solution de « piranha » ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$, 1:1).

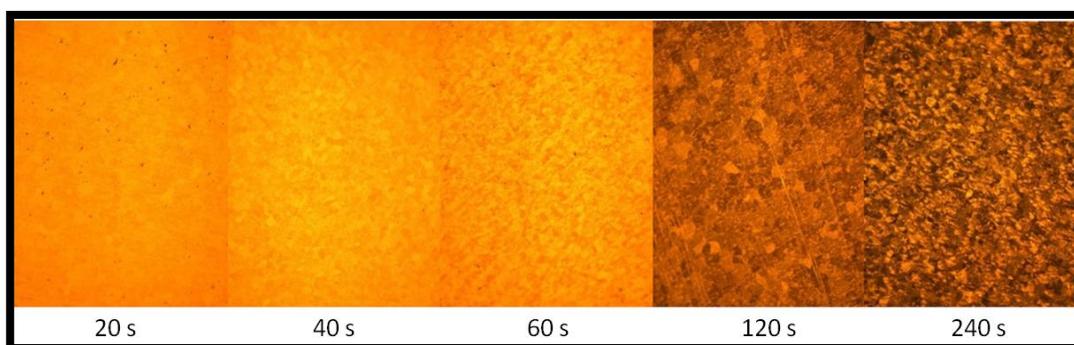


Figure 48 - Vues microscopiques (x20) de la surface des échantillons de titane oxydés par la solution de « piranha » en fonction de la durée d'immersion.

L'état de surface final dépend clairement du temps d'immersion des pièces de titane dans la solution oxydante. Dans le cadre de cette étude, la durée d'immersion a donc été fixée à 120s ; ce qui permet d'obtenir une couche d'oxyde suffisante, tout en conservant un aspect miroir, c'est-à-dire, proche de l'état de surface des stents. Au-delà de cette durée, comme le montre le cliché pris à 240s, une couche d'oxyde très épaisse se forme en surface, augmentant la rugosité du matériau et faisant perdre le bénéfice du polissage miroir.

4.1.2.4.2. Ancre biomimétique à base de dopamine

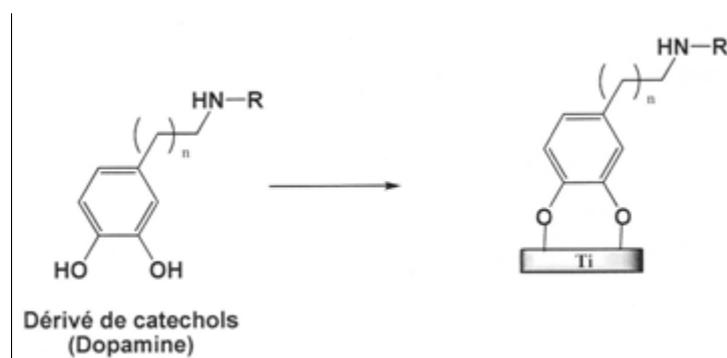


Figure 49 - Principe de la fonctionnalisation chimique du titane par des ancres à base de dopamine

Le greffage des ancres chimiques à base de dopamine s'opère simplement par immersion de la pastille de titane à fonctionnaliser dans une solution aqueuse de dopamine à 5 mg/mL à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant une nuit. Les fonctions catéchols de la dopamine vont alors interagir avec les fonctions hydroxyles présentes en surface du biomatériau (chélation, Figure 49), et générées par l'étape d'oxydation.

4.1.2.4.3. Greffage des polymères de NAS sur le titane

La fonctionnalisation du titane par les polymères de NAS en utilisant la stratégie « graft to » est réalisée par immersion des plaques de titane pendant une nuit, à l'abri de la lumière, dans les solutions aqueuses contenant les polymères synthétisés ($c=5 \cdot 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$) précédemment et dont les caractéristiques sont répertoriées en annexe 2. Après l'étape de greffage, les échantillons sont abondamment rincés par un bon solvant du polymère pour éliminer l'excès de polymère non greffé puis séchés sous d'azote.

Compte tenu de l'électroactivité du motif catéchol, nous avons utilisé la voltampérométrie cyclique (CV) (cf. annexe 4) pour confirmer le greffage du polymère sur la surface de titane.

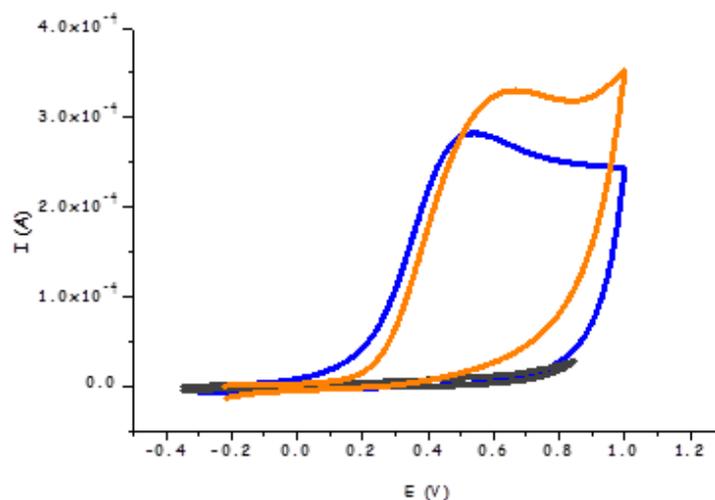


Figure 50 - Voltampérogramme d'un échantillon de titane modifié par la dopamine (polymère de NAS à 100 unités intégrant l'ancre dopamine) (en bleu). Tampon phosphate pH=7, $v=50\text{mV/s}$ vs Ag/AgCl

Le voltampérogramme des échantillons de titane fonctionnalisés par les polymères de NAS (à 100 unités) ont été enregistrés et présentent une vague d'oxydation à 0,6V vs Ag/AgCl (Figure 50, courbe bleue) correspondant à la signature électrochimique caractéristique du motif catéchol, c'est-à-dire à l'oxydation du motif catéchol en quinone par un processus à 2 électrons. Ainsi, on retrouve en surface la signature du motif électro-actif présent sur le polymère et qu'on retrouve sur le voltampérogramme enregistré en solution (Figure 50, courbe orange) à partir du polymère ; ce qui démontre le greffage du polymère sur le titane. L'intégration du signal électrochimique du motif catéchol permet d'estimer la densité de greffage des polymères sur les surfaces de titane en utilisant *Équation 2*.

$$\Gamma = \frac{QN_A}{nFA}$$

Γ = Taux de recouvrement en molécules.cm⁻²
 Q = Quantité de charges
 N_A = Nombre d'Avogadro
 n = nombre d'électrons échangés dans le processus d'oxydo-réduction

Équation 2 - Formule permettant de déterminer le taux de recouvrement Γ à partir de la charge Q mesurée sur chacun des CV.

Dans cette équation, Q représente la quantité de charge, calculée en intégrant l'aire sous le pic d'oxydation, et $n = 2$ correspondant au nombre d'électrons échangés lors de la réaction d'oxydation de la dopamine en quinone.

L'intégration du pic nous permet de calculer la densité de greffage à la surface du titane. Une densité de $1,5 \times 10^{15}$ molécules/cm² a été déterminée, ce qui signifie que la densité de fonctionnalisation est importante.

En conclusion, nous avons démontré que le greffage de polymères parfaitement définis contenant en bout de chaîne un motif catéchol et fonctionnalisé sur la chaîne latérale par une unité glucosamine peut être réalisé en utilisant la stratégie « graft to ». Les études de caractérisation de surfaces montrent que la densité de greffage observée est relativement importante.

Ainsi, la stratégie « graft to » nous a permis d'élaborer de nouveaux biomatériaux hybrides pour un usage thérapeutique. Le paragraphe suivant sera consacré aux évaluations biologiques des surfaces de titane fonctionnalisées par les polymères de glucosamine.

4.1.2.5. Etudes de cytocompatibilité des produits synthétisés et des surfaces de titane fonctionnalisées

Cette partie a pour but d'étudier l'influence des polymères intégrant des motifs glucosamines sur les propriétés biologiques du titane. Dans le cadre de cette étude, des tests sur la viabilité cellulaire (L132), la vitalité et la prolifération cellulaires (HUVEC et MC3T3-E1) ont été effectués.

Ces différents tests biologiques ont été réalisés sur les surfaces non fonctionnalisées, puis sur les polymères avant et après greffage. Les évaluations des échantillons ont été effectuées selon la norme ISO 10993-5³¹⁷.

4.1.2.5.1. Cytocompatibilité du titane

Afin d'évaluer la cytocompatibilité des biomatériaux synthétisés précédemment, des études de vitalité et de prolifération cellulaires ont été réalisées avec des cellules HUVEC (cellules endothéliales) et MC3T3-E1 (cellules ostéoblastiques) sur les pastilles de titane après chaque étape de fonctionnalisation. Dans un premier temps, le titane non fonctionnalisé (poli miroir) a été testé afin d'évaluer l'influence du substrat lui-même sur la prolifération des cellules MC3T3-E1 et HUVEC. Comme évoqué précédemment, différentes méthodes existent pour augmenter le taux de fonctions hydroxyles en surface, et ainsi accroître la capacité d'interaction entre l'ancre du polymère et la surface. Parmi ces différentes méthodes, décrites

dans l'étude bibliographique, deux d'entre elles ont été retenues dans ce travail et évaluées sur le titane :

- l'attaque à l'acide nitrique, permettant une dépollution de la surface.
- l'immersion dans un mélange 1 : 1 de H_2O_2 et H_2SO_4 (communément appelée « solution piranha »), formant une fine couche d'hydroxyde de titane.

Ainsi, les surfaces de titane, une fois traitées et rincées à l'eau ultra-pure, ont été soumises aux tests de vitalité cellulaire et de prolifération cellulaire en présence de cellules ostéoblastiques MC3T3-E1 (origine murine). En effet, cette lignée cellulaire est fréquemment employée pour évaluer la cytocompatibilité des biomatériaux à base de titane, comme par exemple, les implants orthopédiques. Ainsi, les tests de vitalité cellulaire montrent une réponse quasi-identique des cellules vis-à-vis des différents traitements chimiques (Figure 51). Le titane poli miroir présente une excellente cytocompatibilité, avec un taux de vitalité cellulaire à 3 jours proche de 88% [$\sigma \pm 9$] et à 6 jours proche de 98% [$\sigma \pm 6$]. Le titane décapé à l'acide nitrique et le titane traité au piranha présentent une bonne cytocompatibilité à l'égard des cellules MC3T3-E1 après 3 et 6 jours de culture, ce qui confirme les résultats obtenus dans la littérature³¹⁸. Les tests de prolifération cellulaire suivent également cette tendance, sauf pour les échantillons de titane oxydé à l'aide de la solution piranha, où la vitalité cellulaire à 3 jours n'est que de 50%, mais ce résultat est à modérer avec un taux vitalité cellulaire observé beaucoup plus important à 6 jours. Toutefois, la méthode d'oxydation à l'acide nitrique n'a pas retenu notre attention dans un premier temps, dans la mesure où il s'agit d'un processus beaucoup moins oxydatif que le piranha, traitement indispensable au greffage de l'ancre chimique à base de dopamine sur le titane.

Comme nous le verrons ci-après, la réponse des cellules HUVEC à l'égard des échantillons de titane traité au piranha est nettement moins positive. Celle-ci peut être expliquée par la présence de sulfates résiduels sur la surface des pastilles de titane après le traitement piranha

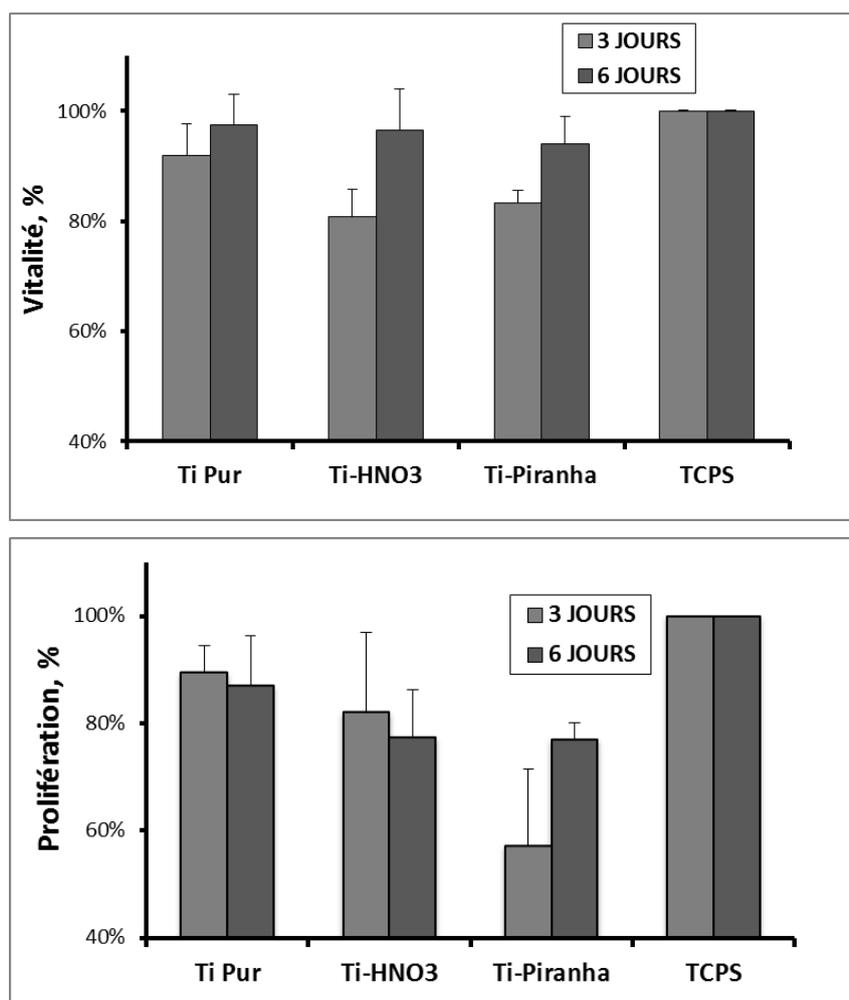


Figure 51 – Tests de vitalité (en haut) et de prolifération (en bas) cellulaires réalisés sur cellules MC3T3 après 3 et 6 jours de de contact avec les pastilles de titane oxydées (n=6).

4.1.2.5.2. Etude de cytocompatibilité de l'ancre chimique dopamine-RAFT

Avant d'évaluer les propriétés biologiques des polymères fonctionnalisés, nous avons étudié la cytocompatibilité de l'agent de transfert dopamine-RAFT, et pour comparaison, celle de la molécule de dopamine, commercialisée sous la forme de chlorure d'ammonium (Figure 52). Pour se faire, nous avons réalisés des tests de viabilité cellulaire en utilisant des cellules épithéliales L132 d'origine humaine (Figure 53). Les tests de viabilité cellulaire montrent une cytotoxicité prononcée pour chacune des ancres chimiques testées incorporant le motif catéchol à des concentrations supérieures à 25 mg/L. Cette constatation est plutôt inattendue, dans la mesure où la dopamine est une molécule synthétisée par le corps humain^{319, 320} et que la littérature concernant l'étude *in vitro* de la dopamine est inexistante.

Afin de déterminer si cette toxicité est imputable au motif catéchol ou à la nature des groupements introduits via l'amine de la dopamine, les mêmes tests biologiques ont été effectués sur un dérivé de dopamine équipé d'une fonction alcyne vraie et sur un dérivé pyrrolique (connu pour sa non toxicité) également doté de la triple liaison carbone-carbone.

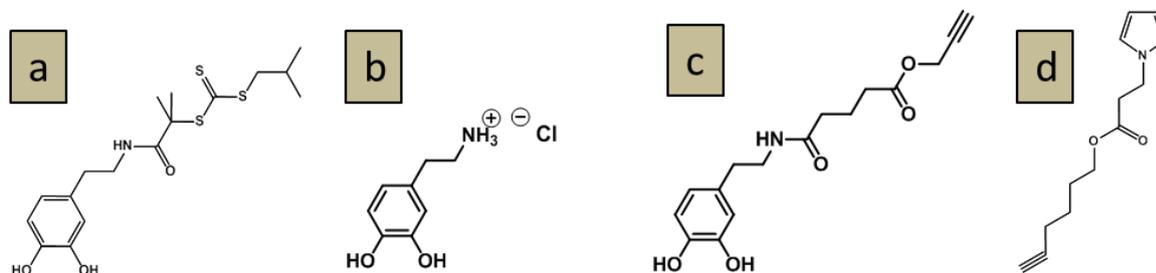


Figure 52 - (a) Structure des différentes molécules synthétisées et testées par études de viabilité cellulaire : a) dopamine-RAFT, b) dopamine (ammonium) (c) dopamine alcyne et (d) pyrrole alcyne.

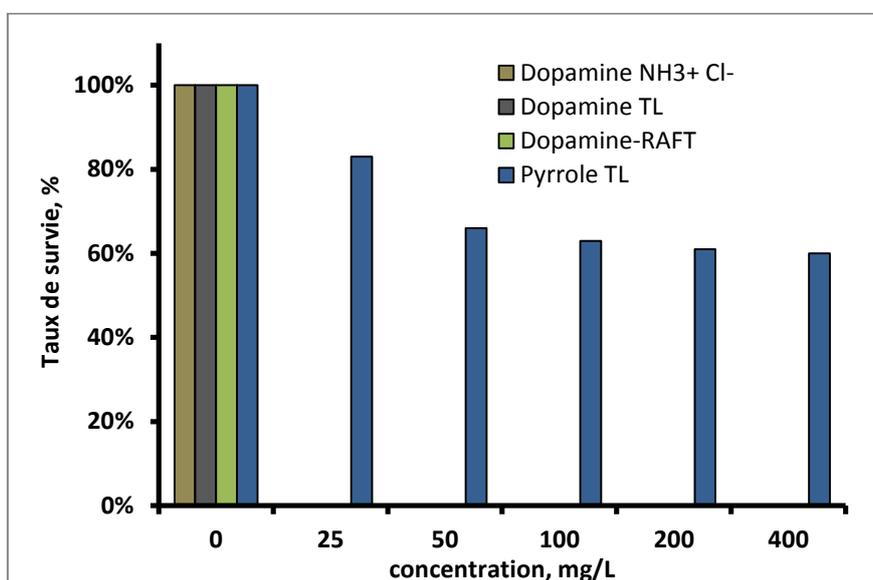


Figure 53 - Viabilité des cellules épithéliales L132 évaluées en présence de concentrations croissantes de poudre à base de dopamine (dopamine, dopamine-RAFT et dopamine-alcyne) et de pyrrole-alcyne ; TL :triple liaison

Les résultats reportés dans la Figure 53 confirment clairement la toxicité du motif catéchol à des concentrations supérieures à 25 mg.l⁻¹ puisque seul le motif pyrrole-alcyne vrai ne montre pas de toxicité, avec un taux de survie des cellules supérieur à 50% à la plus forte concentration testée (400 mg/L).

La toxicité du catéchol n'est pas un obstacle à la poursuite de notre étude. Tout d'abord, la quantité de matière greffée sur les surfaces est de l'ordre de quelques nmol.cm⁻², soit quelques dixièmes de mg.cm⁻². De plus, la partie catéchol sert à immobiliser les polymères sur les

surfaces de titane, elle n'est donc pas accessible aux cellules dans le produit final. Néanmoins, sa toxicité est à prendre en compte pour les études de viabilité sur les polymères non greffés. L'évaluation biologique a ainsi été poursuivie avec les différents polymères synthétisés.

4.1.2.5.3. Etude de cytocompatibilité des polymères de glucosamine

La cytocompatibilité des polymères de glucosamine élaborés à partir du motif dopamine a d'abord été testée avant que ces derniers ne soient greffés sur les pastilles de titane. Ainsi, six polymères différents ont été testés ; ils se différencient par leur longueur de chaîne (50 et 100 unités monomères) et leur taux de fonctionnalisation (10, 20 et 40% de glucosamine).

Remarque : les polymères de pNAS contenant l'ancre dopamine en bout de chaîne n'ont pas été testés en raison de leur réactivité vis-à-vis du milieu de culture. La cytocompatibilité des différents polymères intégrant le motif glucosamine a été évaluée par des tests de viabilité cellulaire réalisés avec des cellules épithéliales L132 (d'origine humaine, annexe 1).

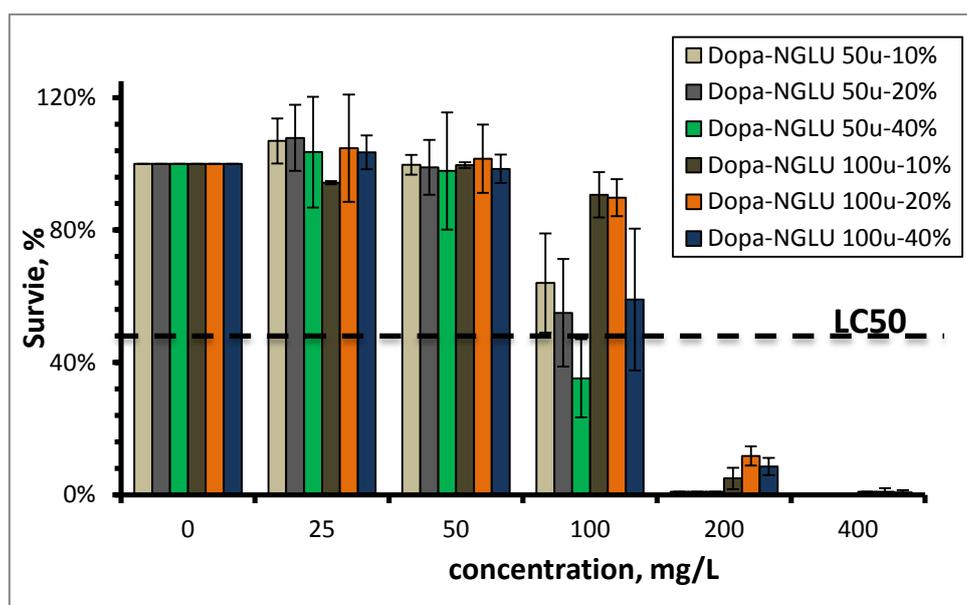


Figure 54 - Viabilité des cellules épithéliales L132 en présence de concentrations croissantes de polymère de glucosamine (n=2)

Nous pouvons observer sur la Figure 54 présentée ci-dessus, que les différents polymères de glucosamine intégrant en bout de chaîne le motif catéchol ne sont pas toxiques jusqu'à la concentration de 100 mg.l⁻¹, contrairement à l'agent de transfert dopamine-RAFT testé précédemment. Ainsi, la cytotoxicité de la dopamine présente en bout de chaîne du polymère dopamine-pNAS-Glu (Dopa-NGlu) est limitée lorsque cette dernière est intégrée au polymère de glucosamine. L'analyse des courbes montre que le taux de fonctionnalisation des chaînes

en glucosamine a une influence sur la viabilité cellulaire. En particulier, les polymères fonctionnalisés à 40 % par la glucosamine présentent une concentration létale LC50 plus basse que les autres polymères, quel que soit la longueur de chaîne. Par conséquent, ils n'ont pas été retenus pour la suite de l'étude.

Le second effet visible est l'influence de la longueur de chaîne sur la viabilité cellulaire. En effet, Les polymères de 50 unités semblent plus toxiques que ceux à 100 unités. Cet écart de toxicité peut être lié aux extrémités de chaînes des polymères. De fait, à concentration massique et à taux de fonctionnalisation égaux, une solution de polymère de 50 unités contient deux fois plus de catéchols (dont la toxicité a été précédemment démontrée) qu'une solution de polymère de 100 unités.

Pour ces raisons, le polymère Dopa-NGlu 100u-20% a servi de référence pour la suite des évaluations biologiques.

Afin d'étudier l'influence des extrémités de chaînes, un test de viabilité cellulaire a été réalisé sur deux polymères de glucosamine, chacun possédant 100 unités de répétition et fonctionnalisés à 20% par la glucosamine, l'un synthétisé avec l'agent de transfert dopamine-RAFT (Dopa-NGlu) et l'autre à l'aide de l'agent de transfert benzyl-RAFT (Benzyl-NGlu).

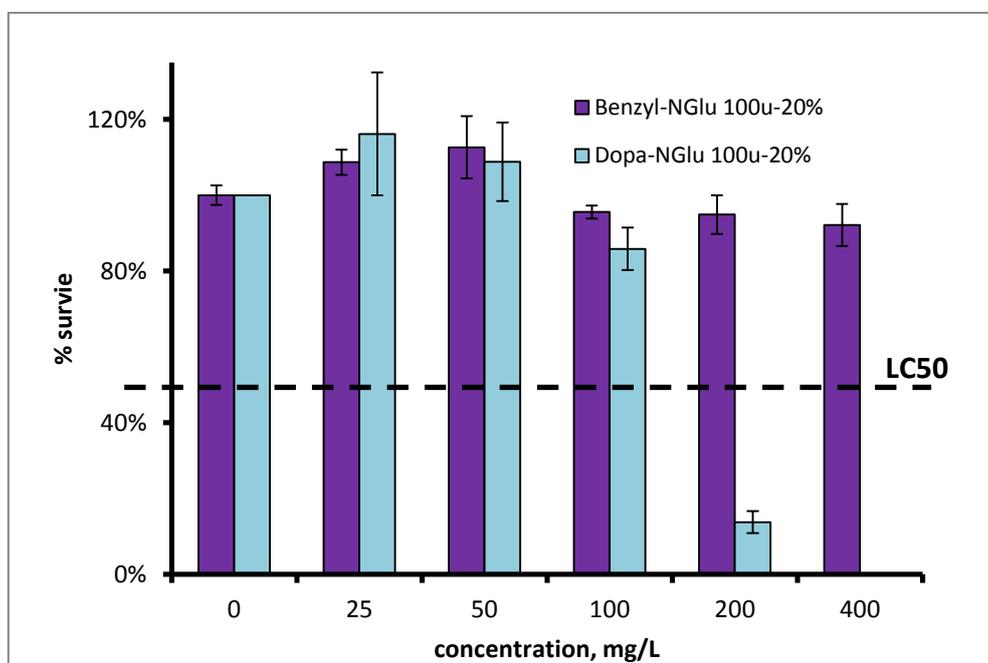


Figure 55 - Influence de la dopamine sur la cytotoxicité du polymère de glucosamine (n=2)

Les résultats (Figure 55) montrent l'innocuité du polymère de glucosamine lorsque celui-ci ne comporte pas de groupement catéchol, alors que le polymère qui possède l'ancre est toxique

pour des concentrations supérieures à 100 mg/L. La toxicité est donc liée pour ces polymères uniquement au fragment catéchol, et non au groupement trithiocarbonate, ni à la chaîne polymère.

Enfin, nous avons vérifié que le motif glucosamine lui-même n'induit pas de cytotoxicité aux polymères. Pour cela, la cytotoxicité de la glucosamine a été évaluée (Figure 56) et comparée au polymère à 100 unités et intégrant 20% de glucosamine. Les études montrent que bien qu'une toxicité du motif glucosamine soit observée pour une concentration supérieure à 80 mg/L, le polymère ne présente pas de cytotoxicité marquée dans cette gamme de concentration ce qui montre que la cytotoxicité observée ci-dessus est imputable uniquement au motif catéchol pour des concentrations supérieures à 100 mg/L.

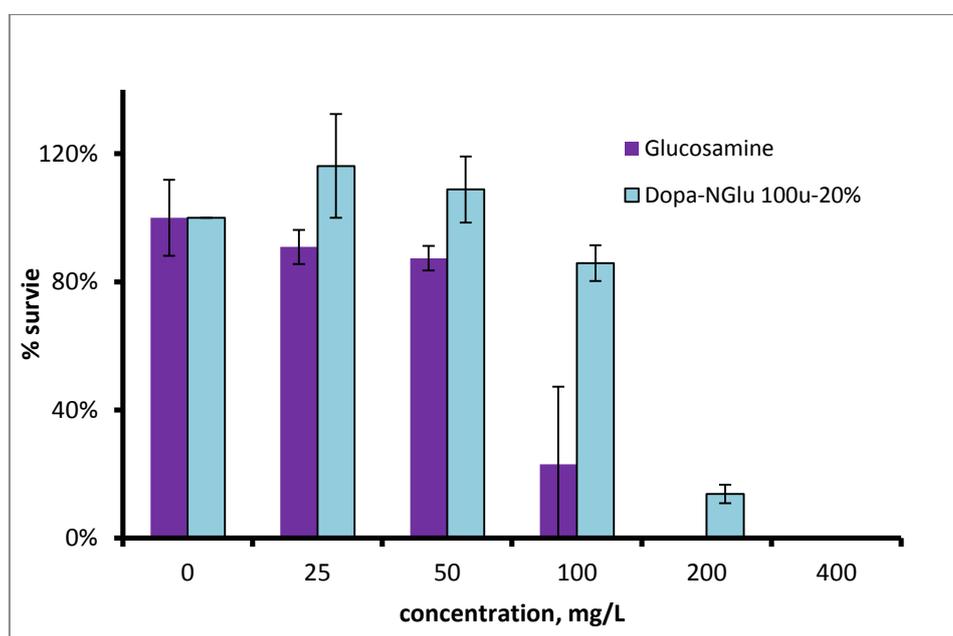


Figure 56 - Influence de la glucosamine dans la cytotoxicité du polymère de glucosamine-(dopamine - pNAS-Glu ou Dopa-NGLu) (n=2)

En conclusion, les études de viabilité cellulaires réalisées ci-dessus montrent que les polymères synthétisés intégrant le motif glucosamine sont cytocompatibles, si et seulement si, la concentration surfacique en polymère fonctionnalisé utilisée pour la conception des implants à base de titane reste inférieure à 100 mg/L.

4.1.2.5.4. Cytocompatibilité des surfaces fonctionnalisées

La vitalité et la prolifération des cellules HUVEC et MC3T3-E1-ont été évaluées sur les surfaces de titane fonctionnalisées par les polymères de glucosamine ; afin de sélectionner les supports candidats pour un dispositif médical implantable.

Une première série de tests de vitalité cellulaire a été réalisée avec des cellules endothéliales HUVEC (Figure 57) afin d'évaluer l'impact du traitement acide.

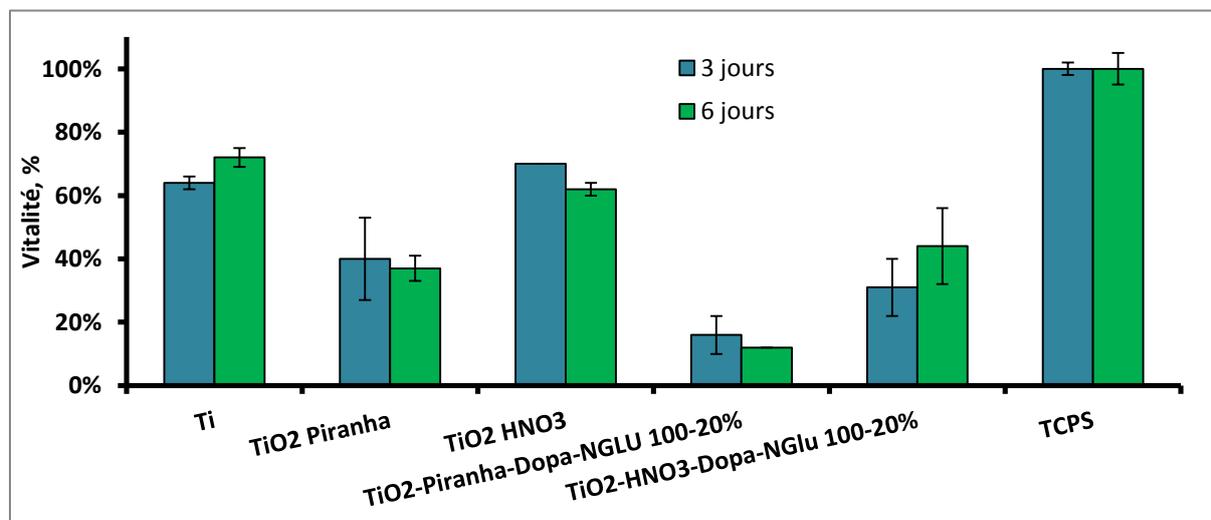


Figure 57 - Vitalité des cellules HUVEC après 3 et 6 jours sur les pastilles de titane fonctionnalisées

Comme cela a été évoqué plus haut dans le manuscrit, les cellules HUVEC prolifèrent moins sur les surfaces traitées au « piranha » (37% de vitalité à 6 jours), comparativement au traitement par acide nitrique (62% à 6 jours); cela est sans doute lié à la présence de sulfates résiduels sur le substrat après le traitement « piranha ». Les résultats obtenus après greffage de polymères sur la surface du titane n'ont pas permis d'améliorer la vitalité des cellulaires comme cela avait été montré dans la littérature.

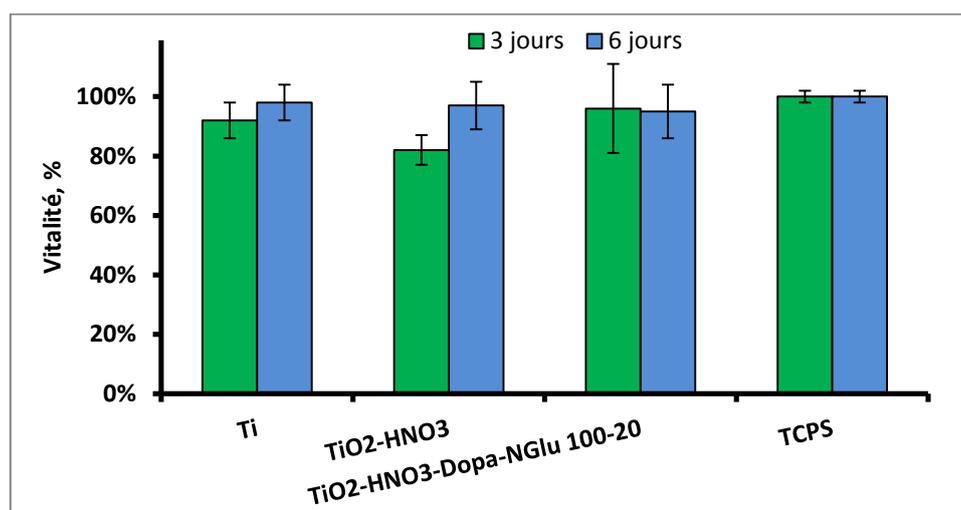


Figure 58 - Vitalité des cellules MC3T3-E1 après 3 et 6 jours sur les pastilles de titane fonctionnalisées

Une autre série des tests de vitalité cellulaire réalisée sur des cellules ostéoblastiques de type MC3T3-E1 montre un effet positif de la fonctionnalisation de surface par les polymères de glucosamine sur la prolifération des cellules ostéoblastiques (Figure 58). Cette lignée de cellule réagit donc favorablement à la fonctionnalisation de surface de titane par le polymère de glucosamine et laisse entrevoir des applications potentielles en chirurgie orthopédique.

A noter, par ailleurs, que les différents échantillons à base de titane (fonctionnalisés ou non) ne présentaient pas de caractère hémolytique.

4.1.3. Discussion générale et conclusion

La polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT a connu un essor considérable ces dernières années ³²¹ pour générer des brosses de polymères à la surface de nombreux substrats. Toutefois, le recourt à ce type de polymérisation pour fonctionnaliser des biomatériaux à base de titane a été très peu exploité ³²²⁻³²⁷. L'utilisation d'ancres chimiques à base de dopamine s'est avérée être un outil très intéressant pour atteindre cet objectif. Ainsi, il a été démontré que la combinaison de la polymérisation de type RAFT et de la chimie de la dopamine permet de greffer, dans des conditions opératoires douces, des polymères parfaitement définis intégrant en chaîne latérale des fonctions bioactives telles que la glucosamine. Les évaluations biologiques ont montré que bien qu'une certaine toxicité soit observée pour le motif catéchol, les polymères fonctionnalisés en bout de chaîne par ce motif et intégrant la glucosamine ne sont pas cytotoxiques pour des concentrations inférieures à 100 mg/L. Par ailleurs, le procédé de fonctionnalisation ainsi que la cytocompatibilité des surfaces de titane résultantes ont pu être optimisés grâce aux nombreuses évaluations physico-chimiques et biologiques réalisées à chaque étape de la fonctionnalisation. Ainsi, l'ensemble des analyses effectuées confirment d'une part la faisabilité du procédé et d'autre part la compatibilité avec le milieu biologique de ces nouveaux implants à base de titane fonctionnalisés.

Néanmoins, les résultats observés avec les cellules endothéliales (HUVEC) sont décevants en vue d'une application dans le domaine cardiovasculaire et bien que dans la littérature, plusieurs auteurs confirment pourtant que la glucosamine favorise la prolifération des cellules endothéliales ^{314, 328}. Les polymères de glucosamine greffés sur le titane via la dopamine contribuent à améliorer la prolifération des cellules ostéoblastiques. Ainsi, ces résultats préliminaires laissent entrevoir de possibles applications de ce modèle à la fonctionnalisation

de surface de titane pour la chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale. Cette perspective nécessite des analyses complémentaires, notamment des tests sur cellules ostéoblastiques primaires.

Dans la continuité de ce travail, plusieurs points peuvent être encore améliorés et sont actuellement en cours d'évaluation :

* Le couplage du polymère de NAS à une autre molécule d'intérêt thérapeutique, ayant un intérêt dans la problématique de resténose et/ou de thrombose intrastent.

*L'utilisation de l'ancre chimique à base de dopamine pour le greffage de polymère ayant une activité dans le domaine cardiovasculaire (système de « drug-delivery »).

En résumé, ce 1^{er} chapitre de thèse avait comme objectif principal, l'élaboration d'une matrice polymère permettant l'immobilisation d'une molécule d'intérêt thérapeutique à la surface du titane. Il constitue la base de travail indispensable à la conception d'un produit aussi complexe qu'un stent pharmaco-actif. Il a permis de renforcer la coordination entre les différents acteurs et a aussi permis d'acquérir une logique et une méthodologie de travail propre à la problématique cardiovasculaire.

Afin de permettre à une plus large gamme de molécule thérapeutique d'interagir avec la plateforme de fonctionnalisation ; nous nous sommes ensuite orientés vers la mise au point d'un système autorisant la libération contrôlée de molécule thérapeutique (Drug-Eluting System) - Pour ce faire, l'ancre chimique à base de dopamine, a été de nouveau exploitée afin de promouvoir le greffage d'un polymère biocompatible à base de cyclodextrines jouant le rôle de réservoir et autorisant la complexation et la libération contrôlées d'agents thérapeutiques.

4.2. Stent fonctionnalisé pour un système à libération prolongée de principe actif

4.2.1. Principe général de fonctionnalisation pour la libération prolongée

Cette deuxième approche consiste à greffer sur le stent un polymère spécifique permettant la libération prolongée d'agents thérapeutiques. Cette stratégie présente un point commun avec la première puisque la dopamine reste le point d'ancrage de ce système sur la surface, mais cette fois, la dopamine est utilisée sous sa forme polymère. En effet, la polydopamine est un polymère bioinspiré qui présente de grandes propriétés adhésives que nous allons exploiter pour greffer à la surface du stent un polymère « réservoir » qui aura la capacité de stocker et de libérer au cours du temps une molécule d'intérêt thérapeutique. Ce polymère, qui contient des molécules complexantes de type cyclodextrines (Figure 59), est élaboré *in situ* par imprégnation du stent fonctionnalisé par la polydopamine dans une solution contenant les cyclodextrines, un agent réticulant (acide citrique) et un catalyseur de réaction (NaH_2PO_2), puis par une étape de thermofixation.

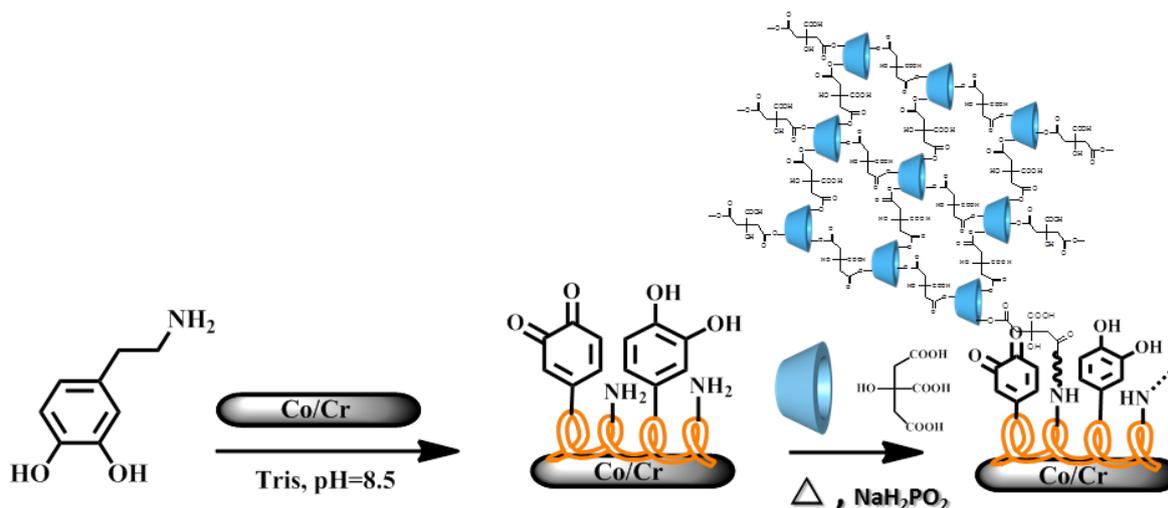


Figure 59- Schéma général de la fonctionnalisation du support métallique par une première couche adhésive de polydopamine et d'une seconde à base de polymère de cyclodextrine aux propriétés complexantes

4.2.1.1. Généralités sur la polydopamine (PDA)

En 2007, inspiré par la composition des protéines adhésives des moules marinières, l'équipe de Messersmith a développé une approche biomimétique de fonctionnalisation d'une large gamme de biomatériaux tels que le 316L, le titane ou le CoCr en utilisant une couche de polymère hautement adhésive de polydopamine²⁷⁶. Cette plateforme de fonctionnalisation a été utilisée par de nombreux auteurs afin d'ancrer une large gamme de biomolécules ou

protéines sur divers biomatériaux ³²⁹⁻³³⁷. Par exemple, Lee *et al.* ont greffé la trypsine sur la couche adhésive de polydopamine ³³⁸; Poh *et al.* sont parvenus à immobiliser un facteur de croissance endothélial (VEGF: vascular endothelial growth factor) via une liaison peptidique entre le peptide et la couche de polydopamine ³³⁹. De la même manière, Yang *et al.* ont greffés de l'avidine ³⁴⁰, et Wei *et al.* ont immobilisé de la sérum albumine ³⁴¹. Dans une problématique similaire à la nôtre, c.a.d. l'amélioration de la thromborésistance de l'implant vasculaire, Bae *et al.* ³⁴² ont immobilisé sur un stent vasculaire en CoCr une couche adhésive de polydopamine chargée positivement permettant l'interaction ionique avec l'héparane-sulfate. De plus, il a été récemment montré que la polydopamine présenterait un effet positif sur la prolifération des cellules endothéliales, alors qu'elle limiterait la prolifération des cellules musculaires lisses endothéliales ^{240, 343}. Cette observation peut être expliquée par l'interaction de la polydopamine avec les protéines du sérum riche en fonctions amines et thiols favorisant l'adhésion des cellules endothéliales. De plus, la polydopamine, riche en quinones aurait une influence sur le fibrinogène, permettant indirectement d'inhiber l'activation et l'adhésion plaquettaire. Enfin, d'un point de vue mécanique, la couche de PDA présenterait, une bonne compliance lors des phases d'expansion et/ou rétraction du stent ^{343, 344}.

Ainsi, compte tenu de ses propriétés, la polydopamine a été utilisée dans ce travail afin de favoriser l'interaction du polymère réservoir à base de CD avec l'implant vasculaire. En effet, bien que la structure de la polydopamine ne soit pas totalement élucidée, celle-ci, en milieu basique, conduit à la formation d'un film organique hautement adhésif qui présente des fonctions amines (Figure 60) capables de se lier de manière covalente et/ou d'interagir avec le polymère de cyclodextrine chargé négativement.

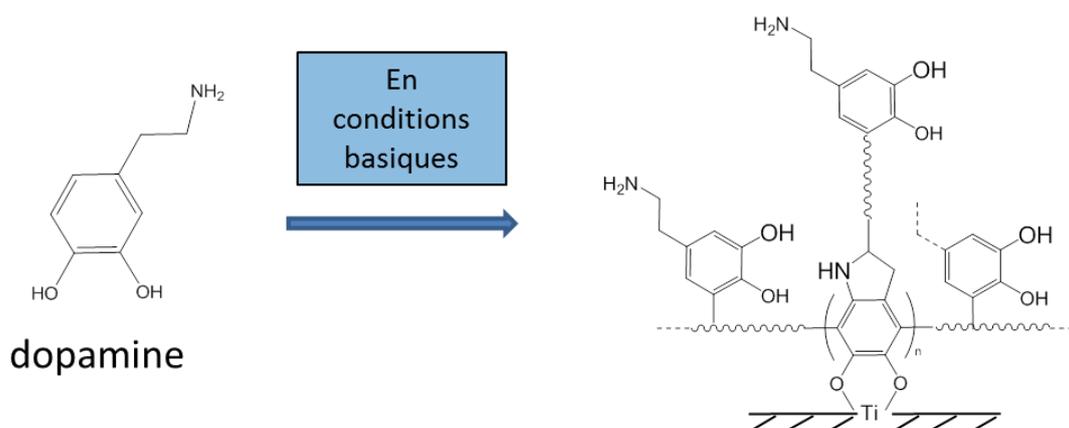


Figure 60- A pH basique, la dopamine polymérise pour former la polydopamine

D'un point de vue mécanistique, Jiang *et al.* ont avancé récemment³⁴⁵ que la dopamine serait facilement oxydée en présence d'oxygène dissous dans la solution en conditions basiques en unités 5,6-dihydroxyindole et 5,6-indolequinone et serait à l'origine d'une cyclisation et d'un réarrangement générant le polymère de polydopamine qui s'apparente à la mélanine^{346, 347}. D'autres auteurs évoquent un arrangement entre motif catéchol et hydroquinone par l'intermédiaire de liaisons hydrogènes et de type π - π stacking. Enfin, l'accroche de la polydopamine sur le support se fait par l'intermédiaire de la formation de chélates entre les hydroxyles de surface du biomatériau et la pince chélatante du motif catéchol (Figure 60).

4.2.1.2. Généralités sur les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CDs) sont des oligosaccharides cycliques constituées d'unités α -D-glucopyranose, obtenues par dégradation enzymatique de l'amidon via une amylose cyclodextrine glycosyl-transférase (CGTase) produite par différents microorganismes^{348, 349}.

Les principales CDs, dites natives, sont l' α CD (6 unités glucosidiques), la β CD (7 unités glucosidiques) et la γ CD (8 unités glucosidiques)³⁵⁰ (Figure 61).

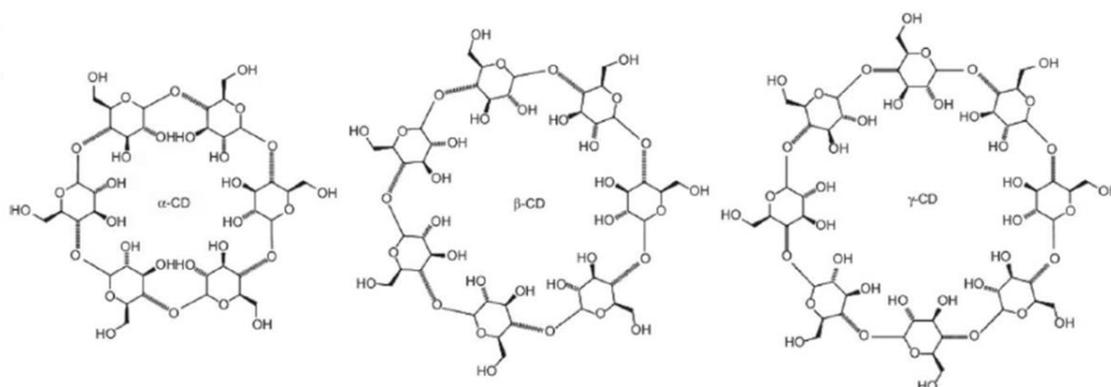


Figure 61 - Formule chimique semi-développée des cyclodextrines α , β et γ ³⁵⁰

Les CDs « natives » peuvent être chimiquement modifiées par substitution de leurs fonctions hydroxyles primaires et/ou secondaires pour conduire à des dérivés de CDs comme la 2-hydroxypropyl- β CD³⁵¹, la méthyl- β CD³⁵² et des dérivés sulfatés amphiphiles de l' α -, β - et γ CD³⁵³. Parmi ces dérivés, l'hydroxypropyl-cyclodextrine qui a subi une substitution partielle de ses fonctions hydroxyles primaires et/ou secondaires par le groupe 2-hydroxypropyl³⁵¹, est celle qui est la plus utilisée. La structure tridimensionnelle des CDs s'apparente à une cage qui présente une cavité interne hydrophobe et une enveloppe extérieure hydrophile^{354, 355}. Ainsi, ces molécules cages sont capables de former des complexes d'inclusion (hôte—invitée)

réversibles (Figure 62) avec un grand nombre de molécules organiques hydrophobes^{354, 356} par l'intermédiaire de liaisons faibles de type de Van der Waals, interactions hydrophobes, liaisons hydrogènes, etc...³⁵⁷.

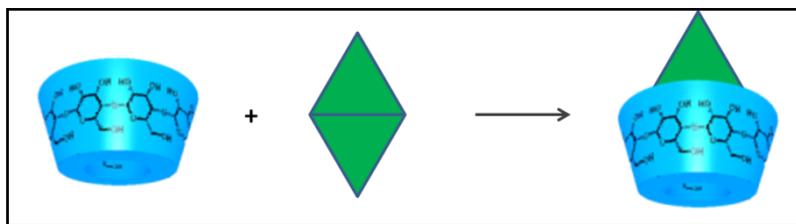


Figure 62- Schéma de la formation d'un complexe d'inclusion à partir des cyclodextrines

L'adéquation de taille et de forme entre la cavité de la CD et de la molécule invitée conditionne le phénomène de complexation. De manière générale, l' α CD présente une affinité plus marquée à l'égard des molécules de faibles masses moléculaires ou possédant une chaîne aliphatique, la β CD présente une bonne affinité avec les molécules contenant un cycle aromatique ou hétérocyclique, tandis que la γ CD aura plus d'affinité avec les composés aromatiques, ou des cycles aromatiques substitués.

Les propriétés physico-chimiques ou biologiques de nombreux produits industriels sont ainsi améliorées grâce aux CDs notamment dans les domaines du textile, sanitaire, agroalimentaire, cosmétique, ou pharmacologique³⁵⁰. L'apport de CDs dans ces produits est à l'origine :

- d'une augmentation de la solubilité dans l'eau d'une molécule lipophile,
- d'une diminution de la volatilité d'une molécule,
- d'une protection contre les réactions d'oxydation de la molécule,
- d'une réversibilité du complexe d'inclusion qui permet la libération prolongée de la molécule invitée.

Par ailleurs, grâce à leur cytocompatibilité et leur capacité à former des complexes d'inclusion avec des molécules d'intérêt thérapeutique, les cyclodextrines représentent le vecteur idéal dans un système de libération prolongée dans le domaine des dispositifs médicaux. Plusieurs travaux ont reporté l'emploi de cyclodextrines pour la fonctionnalisation de supports, mais la plupart d'entre eux n'ont pas été évalués dans le cadre d'une application biologique^{358, 359}.

Le procédé de fonctionnalisation de biomatériaux par un polymère de cyclodextrine décrit et breveté par Martel *et al.*³⁶⁰ utilise, quant à lui, une chimie verte facilement transposable à de nombreux dispositifs médicaux (dont les stents). Ce procédé repose sur la réticulation des cyclodextrines ou de leurs dérivés par les acides polycarboxyliques (PCA) en utilisant une réaction de polycondensation (polyestérification). Dans un premier temps, l'acide

polycarboxylique sous l'action de la chaleur et en présence du catalyseur va se déshydrater et donner un anhydride qui va ensuite réagir avec une fonction hydroxyle de la cyclodextrine pour donner un ester et régénérer une fonction acide pouvant réagir par la suite par le même mécanisme avec une autre fonction hydroxyle des cyclodextrines.

Cette réaction de polyestérification entre les groupes hydroxyles des CD et les fonctions carboxyliques du PCA permet de créer un réseau tridimensionnel réticulé formé de cavités (cyclodextrines) et de fonctions carboxylates (fonctions carboxyliques du PCA qui n'ont pas réagi).

Cette réaction est dépendante de la température, du temps de traitement thermique, et de la concentration des réactifs. La nature de l'acide polycarboxylique, de la cyclodextrine et du catalyseur utilisés influencent directement cette même réaction. Des travaux antérieurs réalisés dans notre laboratoire ont permis de définir le meilleur ratio entre ces 3 composés en fonction du dispositif médical. Par exemple, ce ratio est fixé à 8/1/10 (en gramme pour 100 mL d'eau ultrapure) pour respectivement l'acide polycarboxylique, le catalyseur et la CD dans le cas de textiles et à 10/3/10 dans le cas de matériaux présentant une porosité (membranes, hydroxyapatite (HA) macroporeux), une rugosité (revêtement d'HA sur le titane) ou des fonctions réactives en surface (cellulose)^{210, 361, 362}. Dans ce travail, c'est le ratio 10/3/10 qui a été choisi car le système que nous développons consiste à apporter des fonctions amines réactives en surface du stent par l'intermédiaire d'un revêtement organique à base de polydopamine.

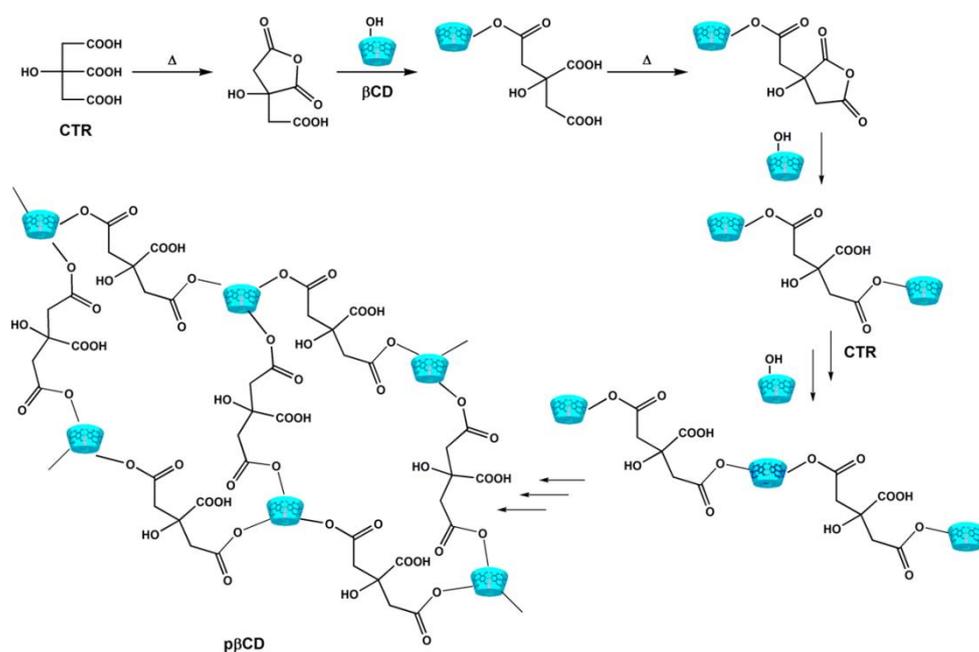


Figure 63 – Mécanisme de formation du polymère de cyclodextrine (PCD) à partir du mélange CTR/NaH₂PO₂/βCD avec un ratio 10/3/10

Pour que la réaction ait lieu, les acides polycarboxyliques doivent comporter au moins trois fonctions acides carboxyliques car la formation d'un anhydride nécessite deux de ces fonctions. Plusieurs acides polycarboxyliques peuvent être utilisés, par exemple l'acide citrique (CTR, trois fonctions acides), l'acide 1,2,3,4-butane tétracarboxylique (BTCA, quatre fonctions acides), l'acide polyacrylique (PAA), etc. La nature de l'acide polycarboxylique peut aussi avoir une influence selon le type du support utilisé. En effet, les travaux menés par Leprêtre *et al.* montrent que l'hydroxyapatite est très sensible à l'acide citrique pouvant aller jusqu'à la solubilisation de celui-ci ³⁶³. Dans notre étude, le support métallique n'est pas sensible à l'acide citrique, nous l'avons sélectionné car il a déjà été utilisé pour la fonctionnalisation de prothèses vasculaires en polyester tissé par un procédé analogue. Les études *in vivo* avaient montrées l'innocuité de ce revêtement utilisant la HPβCD et l'acide citrique ³⁶⁴. De plus, les études de Ducouroy *et al.* montrent que le rendement de la polycondensation avec le CTR est le plus intéressant ³⁶⁵. Ainsi, cette réaction de polycondensation, faisant intervenir les CDs, a permis le développement d'une plateforme de fonctionnalisation de dispositifs médicaux. Ce revêtement confère alors à ces derniers la propriété d'adsorber et de libérer de manière prolongée des molécules thérapeutiques, grâce aux cavités des CDs (interactions hydrophobes) d'une part, aux groupements carboxyliques du réseau (liaisons ioniques) et aux cavités du réseau tridimensionnel (liaisons hydrogènes) d'autre part.

Cette plateforme a été utilisée avec succès sur de nombreux dispositifs médicaux implantables :

- Les prothèses vasculaires en polyéthylène téréphtalate (PET) fonctionnalisées avec le polymère de HPβcyclodextrines (PHPβCD) pour la prévention primaire et secondaire des infections prothétiques. Trois antibiotiques d'intérêts dans cette problématique ont été testés seuls ou en association : vancomycine, rifampicine, et ciprofloxacine. Les résultats ont montrés une adsorption améliorée des principes actifs sur les prothèses fonctionnalisées, associée une libération prolongée et une activité antibactérienne *in vitro* et *in vivo* pendant 7 jours ^{214, 364, 366-370}. La prothèse vasculaire en PET "Polymaille Cyclograft®" des Laboratoires Pérouse Medical (Ivry le temple, France) issu de ces travaux est en cours de marquage CE (étude clinique multicentrique terminée - résultats non publiés).

- Les membranes en polyfluorure de vinylidène (PVDF), utilisées comme dispositif pour la régénération tissulaire guidée en parodontologie ont été fonctionnalisées avec le polymère de β cyclodextrine (P β CD) pour la libération contrôlée d'un antiseptique (chlorhexidine) pour limiter l'infection de la membrane pendant la phase de régénération tissulaire ^{361, 371}.
- La cellulose oxydée fonctionnalisée par le polymère de β CD (P β CD) pour la libération prolongée d'un agent antiseptique, le digluconate de chlorhexidine pour le traitement des parodontites sévères ³⁶².
- Les plaques de renfort de la paroi abdominale en PP (polypropylène) ou PET (polyéthylène téréphthalate) ont été fonctionnalisées avec le polymère de HP β CD (PHP β CD) et chargées de ciprofloxacine pour la prévention primaire et/ou secondaire de l'infection en chirurgie viscérale ³⁷². Dans cette même application, mais à visée analgésique, des anesthésiques locaux de type ropivacaïne ont pu être chargés sur les implants fonctionnalisés par le polymère de cyclodextrine pour limiter les douleurs post-opératoires à risque de chronicisation.
- Les biocéramiques phosphocalciques ou les implants métalliques revêtus de ces mêmes biocéramiques ont été fonctionnalisés par le polymère de cyclodextrine pour limiter respectivement les risques de récurrences de cancer avec l'adsorption de cis-platine ³⁷³ et les infections post-opératoires avec l'adsorption de gentamicine ²¹⁰.

4.2.1.3. Généralités sur les alliages métalliques utilisés

4.2.1.3.1. Le Titane et ses alliages

Après avoir mené à bien la fonctionnalisation par immobilisation sur le titane, les premiers tests de fonctionnalisation du système de libération ont été réalisés sur les pastilles de titane. Il faut noter que les stents utilisés en chirurgie vasculaire ne sont pas en Titane pur mais en alliage de Titane NiTiNOL à mémoire de forme. Afin de rapidement comprendre les contraintes d'une telle application à la surface d'un stent vasculaire, le procédé de fonctionnalisation a été transféré sur des stents en NiTiNOL, alliage composé à 51% de Titane, 49% de Nickel (Luminexx, C. R. Bard, Inc., Murray Hill, New Jersey). Avant d'optimiser les paramètres et pour juger de la faisabilité technique du procédé, un stent en NiTiNOL a subi toutes les étapes de fonctionnalisation selon la méthode décrite par Taha *et al* sur les implants métalliques recouvert d'une couche d'hydroxyapatite ²¹⁰. Un traitement thermique à 160°C pendant 30 minutes a été appliqué sur le stent modifié avec la polydopamine puis imprégné dans une solution contenant la β CD, le catalyseur et l'acide citrique en proportion 10/3/10.

Malheureusement, le traitement thermique imposé par notre procédé de fonctionnalisation a complètement dénaturé l'alliage de NiTiNOL, le rendant indéformable et cassant (Figure 64). Ce résultat n'était pas attendu d'autant plus que le NiTinol, théoriquement doit conserver sa caractéristique super-élastique jusqu'à plus de 200°C³⁷⁴. Face à ce verrou technologique non résolu, nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un autre alliage largement utilisé en pathologie cardio-vasculaire, le Cobalt-Chrome (CoCr).

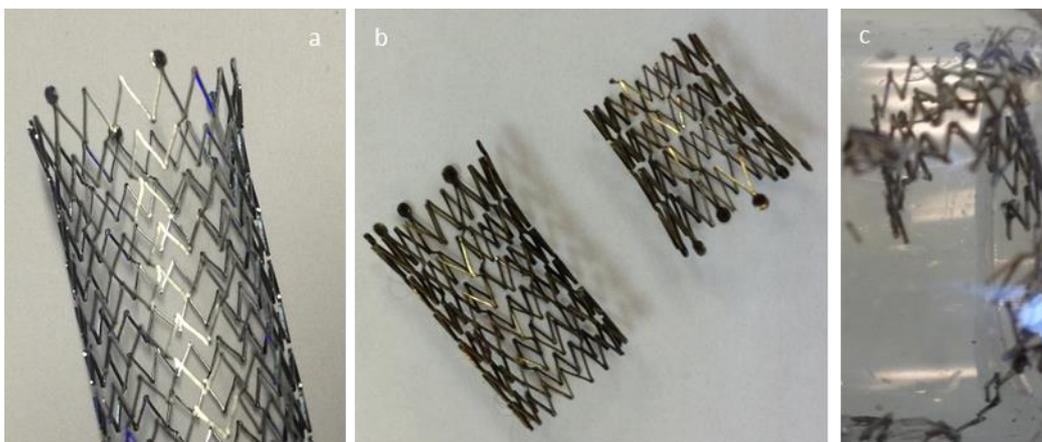


Figure 64 - Stents en NiTinol non fonctionnalisés (a), fonctionnalisés par la polydopamine (b) puis enfin par le PDA-PCD (c). Au retrait du stent de son batch de cyclodextrine, la structure se brise comme une feuille

4.2.1.3.2. L'alliage de cobalt (CoCr)

L'alliage de Cobalt riche en chrome a déjà été présenté dans la première partie de ce manuscrit. Il n'est pas utilisé en pathologie vasculaire pour ses propriétés super-élastiques et de mémoire de forme, mais pour ses performances en termes de force radiale et d'excellente résistance à la corrosion. C'est l'alliage que nous avons choisi pour optimiser le procédé de fonctionnalisation pour la libération prolongée d'agents thérapeutiques.

Le mécanisme d'interaction entre la première couche de polydopamine et le support métallique (CoCr) est exactement le même que pour le Titane qui requiert la génération de fonctions hydroxyles capables de former des liaisons avec la polydopamine.

Pour s'approcher le plus possible de la morphologie de surface des stents, les pastilles de CoCr ont été polies par une polisseuse mécanique fournissant un aspect miroir.

Dans le cas du CoCr, le procédé d'oxydation chimique à base de peroxyde a été modifié compte tenu des propriétés spécifiques du CoCr. En effet, l'utilisation du CoCr en tant que prothèse est essentiellement due à son excellente résistance à la corrosion, il est donc plus difficile de l'oxyder que le Titane. En se basant sur les travaux de Vetrone *et al.*²¹¹, le ratio acide sulfurique / peroxyde d'hydrogène (H₂SO₄/H₂O₂) du traitement piranha a été augmenté

à 70% / 30% pour un temps d'immersion de la pastille dans la solution oxydante de plus de 60 heures ²¹². Pour rappel, les pastilles de titane étaient oxydées pendant 2 minutes dans une solution H₂SO₄/H₂O₂ à 50%/50%.

4.2.2. Résultats et discussion

4.2.2.1. Optimisation du procédé de fonctionnalisation des pastilles de CoCr

Pour l'étude des paramètres de fonctionnalisation, le ratio des réactifs utilisés pour la polycondensation du polymère de CD (CTR/NaH₂PO₂/MeβCD ou βCD) a été fixé à 10/3/10 (g/100 ml d'eau) d'après les travaux de Taha et al. ²¹⁰.

4.2.2.1.1. Optimisation des paramètres de greffage de la PDA

Comme évoqué précédemment, la dopamine à pH basique forme un polymère de polydopamine (PDA) contenant un nombre important de fonctions amines ³⁷⁵ qui sont indispensables pour le greffage du polymère de cyclodextrine par formation de liaisons amides. Afin d'optimiser le greffage de la polydopamine (temps d'imprégnation et recuit) sur le support, la quantification des fonctions amines résultantes du greffage de la PDA et présentes en surface du CoCr a pu être effectuée de façon directe par spectrophotométrie UV-vis en utilisant la méthode de l'acide orange II ²¹⁵. Pour évaluer l'influence de ces différents paramètres sur (i) la fixation du PCD, (ii) l'évolution de la quantité adsorbée et (iii) la cinétique de libération du TBO (molécule modèle) dans le PBS, le PCD a été greffé sur les échantillons. Dans ce cas, les paramètres de fonctionnalisation du CoCr-PDA par la PCD sont arbitrairement ceux optimisés par Taha et al. (CTR/NaH₂PO₄/MeβCD ; 10/3/10 ; 160°C, 30 min) ²¹⁰ ; puis ils feront ensuite l'objet d'une étude plus approfondie.

Le dosage AO réalisé par spectrophotométrie UV montre que le nombre de fonctions amines greffées en surface augmente, comme attendu, lorsque le temps d'imprégnation du support dans la solution de dopamine/trizma base (2 mg/ml) augmente ³⁷⁶. Après 16 heures d'imprégnation dans la dopamine, la quantité d'AO et par conséquent, la densité de fonctions amines atteint 6 nmol/cm² sur les pastilles fonctionnalisées par la PDA alors qu'une densité de 3 nmol/cm² de fonctions amines avait été mesurée sur les pastilles ayant été immergées 1 heure (Figure 65).

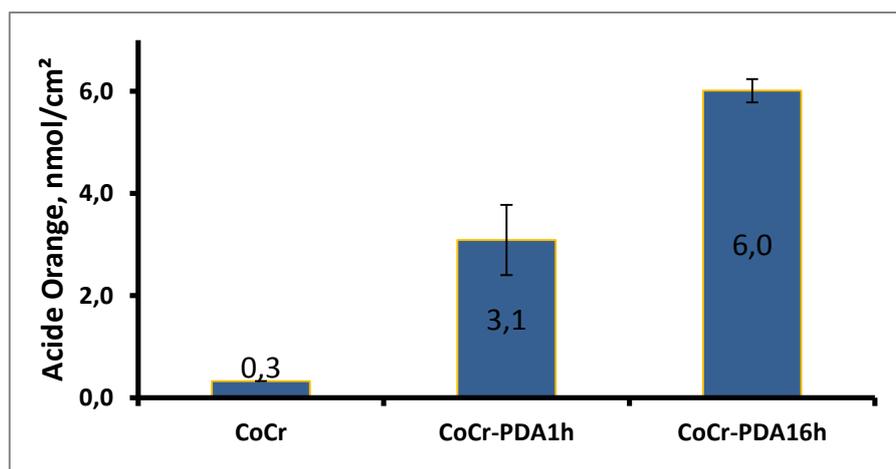


Figure 65 - Influence du temps d'immersion (1h et 16h) du CoCr dans la solution de dopamine sur la quantité de fonctions amines présente sur le CoCr-PDA par la méthode de l'acide orange II

Ce résultat est confirmé par quantification du TBO lorsque le procédé de fonctionnalisation est poursuivi jusqu'à son terme, c.a.d. après thermofixation du PCD. La Figure 66 montre que le polymère de cyclodextrine se greffe difficilement sur le CoCr, s'il n'a pas été préalablement traité avec la PDA ce qui démontre le rôle clé joué par la PDA. En effet, la quantité de TBO adsorbée n'est que de 54 nmol/cm² (avec un écart type tout aussi important) alors qu'elle est de 263 et 468 nmol/cm² lorsque le CoCr est traité avec la PDA pendant 1 et 16 heures respectivement. Le temps d'immersion de la PDA optimal est donc 16 heures, ce qui est en accord avec les travaux de Kang *et al.*³⁷⁵.

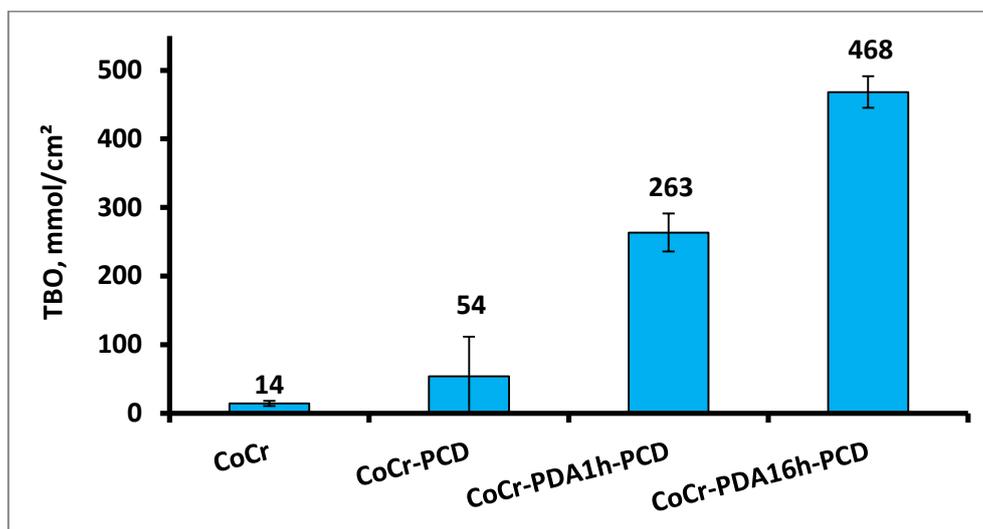


Figure 66 - Influence du temps d'immersion (1h et 16h) du CoCr dans la solution de PDA sur la quantité de TBO adsorbée par le CoCr-PDA-PCD (après fonctionnalisation par le PCD)

Récemment, il a été démontré par Luo *et al.* que le traitement thermique de la monocouche de PDA était bénéfique pour la cytocompatibilité du revêtement³⁷⁷. En effet, celui-ci favoriserait

la prolifération des cellules endothéliales tout en limitant l'effet de facteurs de la coagulation et des plaquettes^{343, 375}.

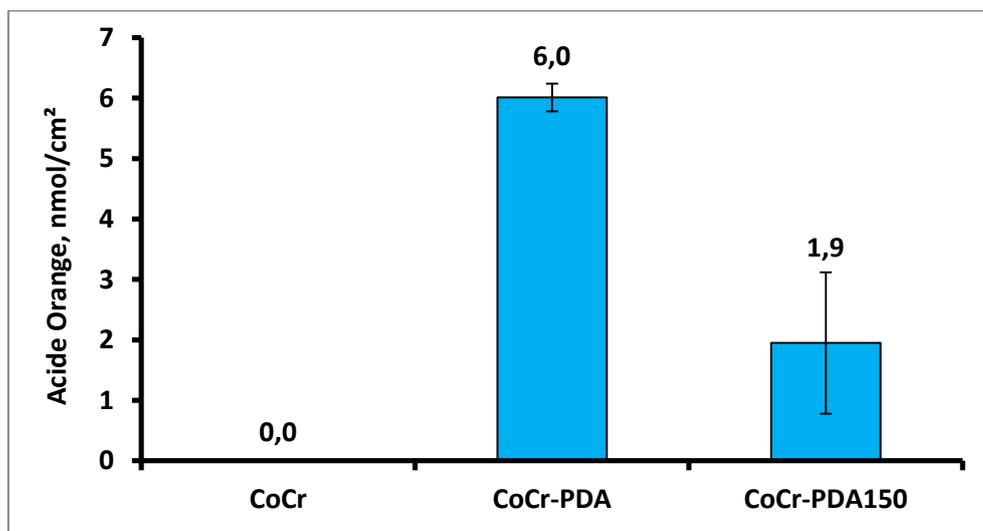


Figure 67 – Influence du traitement thermique du CoCr fonctionnalisé par la PDA (CoCr PDA est le groupe contrôle sans recuit) sur le dosage des fonctions amines par la méthode de l'acide orange II

Ces résultats ont été attribués à la formation d'une monocouche de PDA plus riche en groupements quinone. Cette réorganisation de la PDA a pu être caractérisée par un dosage à l'acide orange en comparant une pastille de CoCr fonctionnalisée avec la PDA ayant subi ou non un traitement thermique. La Figure 67 montre que le nombre de fonctions amines sur le CoCr-PDA diminue de 6 à 1,9 nmol/cm² après un traitement thermique à 150°C pendant 60 minutes. Ce traitement thermique conduit à une réticulation du PDA via la formation de dérivés indoles consommant des fonctions amines³⁴³.

Paradoxalement, le traitement thermique, réduisant le nombre de fonctions amines disponibles en surface, n'affectait pas le greffage de la PMe β CD et semblait même homogénéiser et stabiliser la couche de polymère sur le CoCr-PDA. L'impression visuelle de la robustesse du revêtement n'ayant pas subi de recuit était sans équivoque : des grappes de polymère se détachent de la surface par simple immersion dans le PBS. La Figure 68 montre clairement que le revêtement de PCD (coloré en bleu avec le TBO) était toujours présent sur une pastille CoCr-PDA ayant subi un recuit après 6 jours d'immersion dans la PBS alors qu'il est complètement dégradé lorsque le revêtement de PDA n'est pas recuit.



Figure 68 - Images de pastilles de CoCr-PDA-PCD après 6 jours dans le PBS. Sur la gauche de l'image, le revêtement de PCD a subi un traitement thermique (150°C-1h) alors que sur la droite de l'image le revêtement n'a pas subi de traitement thermique

Ce résultat peut être logiquement attribué à la réticulation de la couche de PDA pendant le traitement thermique accompagné d'un renforcement du lien d'ancrage du polymère sur la surface de métal oxydé.

Dans le but d'optimiser cette étape de recuit de la PDA et d'améliorer le greffage du PCD, nous avons étudié l'influence de la température de recuit (150, 160, 170 et 180°C) sur l'adsorption et la libération du TBO (Figure 69 et Figure 70).

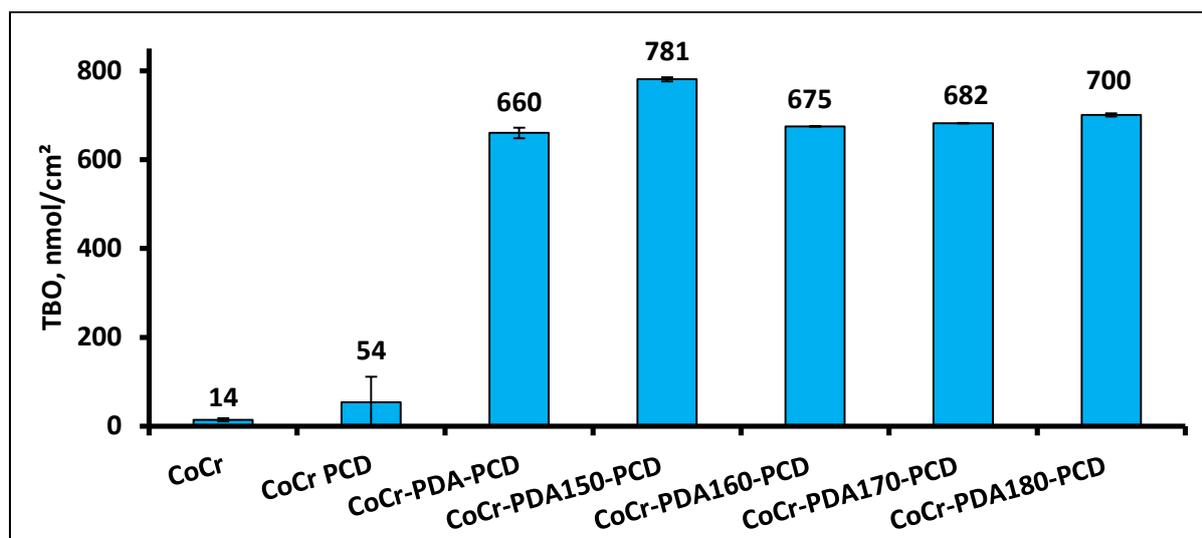


Figure 69 - Influence de la PDA et de la température de recuit de la PDA sur la quantité de TBO adsorbée par les échantillons de CoCr fonctionnalisés

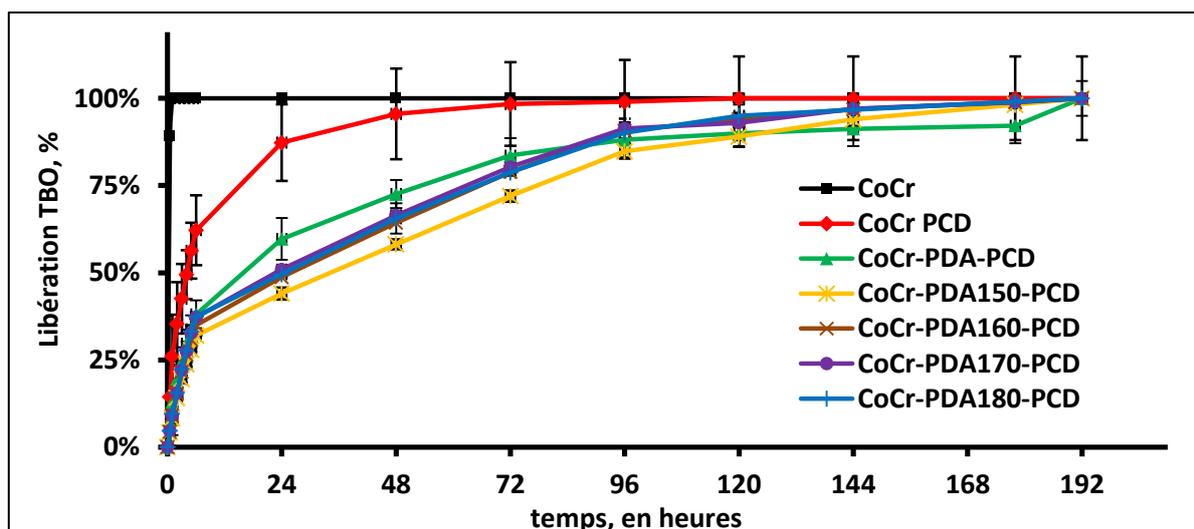


Figure 70 - Influence de la PDA et de la température de recuit sur la cinétique de libération du TBO adsorbée sur les échantillons de CoCr fonctionnalisés

La Figure 69 et la Figure 70 confirment qu'en l'absence de PDA, le PCD se greffe difficilement sur le CoCr ; ce qui se traduit par une adsorption faible du TBO (54 nmol/cm²) et une libération rapide dans le PBS (<72 heures).

Le greffage d'une monocouche de PDA augmente considérablement l'accroche du PCD, ce qui se traduit par une augmentation de la quantité de TBO adsorbée (675 à 781 nmol TBO/cm²) et du temps de libération (> 7 jours) pour les pastilles recuites et non recuites. Même si la différence en termes d'adsorption et de libération est peu évidente entre les échantillons recuits et non recuits, nos précédentes observations visuelles ont validé la nécessité de recuire la PDA pour stabiliser cette couche et ainsi éviter une dégradation trop rapide risquant de générer des débris de polymère de taille importante dans le flux artériel.

Concernant les 4 températures testées, le recuit de la PDA à 150°C a été jugé comme permettant le meilleur compromis entre la quantité de TBO chargée (781 nmol TBO/cm²) et la période de libération (allant jusqu'à 192h).

En conclusion, le greffage de la première couche de PDA sur les pastilles de CoCr se fera comme suit :

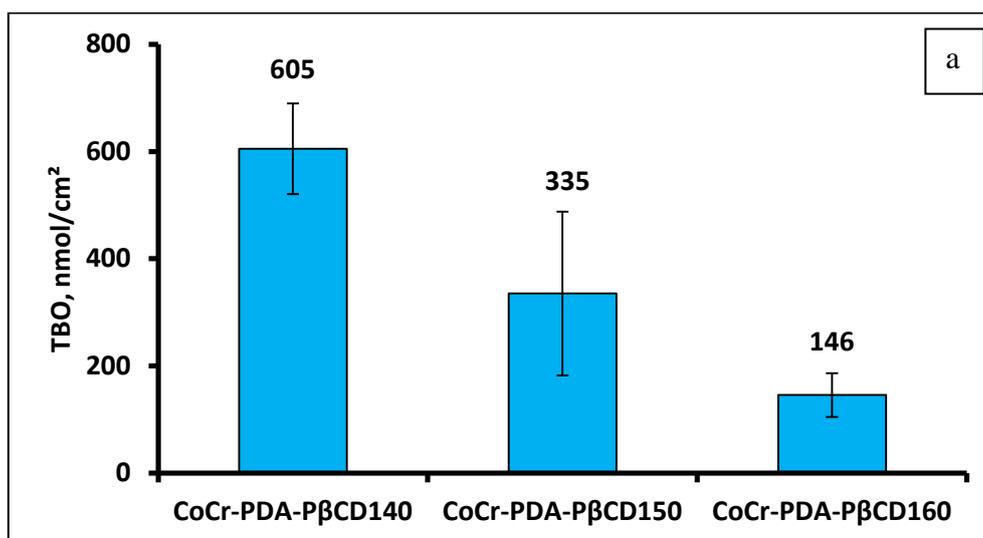
- CoCr oxydé (H₂SO₄/H₂O₂ – 70%/30%)
- Imprégnation dans une solution de dopamine (pH 8,5 ; 2 mg/ml, 16 heures)
- Recuit à 150°C pendant 1 heure

4.2.2.2. Optimisation des paramètres de greffage du PCD

4.2.2.2.1. Optimisation du temps et de la température de greffage

Les pastilles de CoCr ont été oxydées puis fonctionnalisées par une première couche de polydopamine (PDA) selon le procédé optimisé ci-dessus ce qui permet maintenant d'envisager l'optimisation du greffage du PCD (P β CD ou PMe β CD). L'influence de la température (140, 150 et 160°C) et du temps (20, 30, 45 et 60 min) de polycondensation de la PCD sur l'adsorption et la libération de TBO ont été successivement étudiés. Pour l'étude de la température, le temps de greffage du PCD a été fixé à 30 minutes arbitrairement, ce paramètre sera évalué par la suite.

La Figure 71 montre que le greffage du PCD sur le CoCr-PDA dépend de la température mais également de la nature de la CD choisie. En effet, dans le cas de la β CD, la quantité de TBO adsorbée optimale est obtenue lorsque le PCD est greffé à une température de 140°C alors que cette température doit être au moins de 150°C dans le cas de la Me β CD. La Figure 71a montre également que plus la température de fixation de la P β CD augmente et plus la quantité de TBO adsorbée diminue. Ceci est probablement dû au degré de réticulation du P β CD qui augmente avec la température rendant moins disponible les cyclodextrines et consommant progressivement les fonctions carboxyliques. La Figure 71b montre que la température de greffage du PMe β CD de 140°C semble trop faible pour permettre une réticulation. En effet, une partie du revêtement de PMe β CD se détachait lors de la phase d'imprégnation dans le TBO. Par contre, aucune différence en termes de quantité de TBO adsorbée à 150 et 160°C n'a été observé (Figure 71). Au vu de ces premiers résultats, nous n'avons pas poursuivi les études de libération de TBO avec l'échantillon où la PMe β CD est fixé à la température de 140°C (Figure 72).



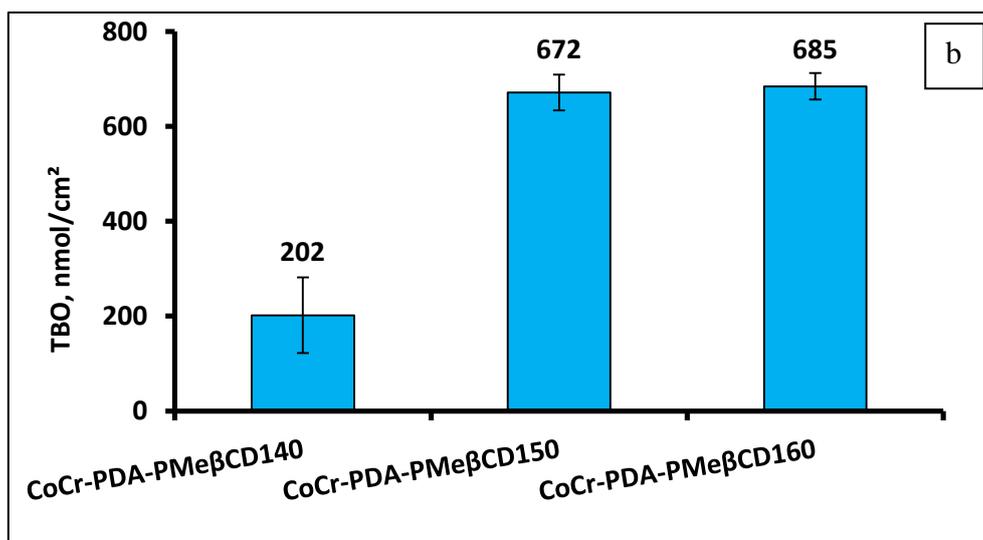


Figure 71 - Influence de la température de polycondensation de la PβCD (a) et PMβCD (b) sur la quantité de TBO adsorbée (temps de fixation 30 minutes)

La Figure 72 montre que la cinétique de libération du TBO dépend également de la température de fixation et de la nature de la cyclodextrine. Concernant les échantillons fonctionnalisés avec le PβCD (Figure 72a), plus la température de fixation augmente et plus la libération du TBO est rapide (6 heures à 140°C vs 96 heures à 140°C). Ces résultats sont en accord avec le dosage quantitatif du TBO. Concernant les échantillons fonctionnalisés avec le PMβCD (Figure 72b), les résultats montrent également une libération plus rapide du TBO lorsque la température de fixation augmente (72 heures à 160°C vs. 120 heures à 150°C). Quel que soit la cyclodextrine, l'effet « burst » est plus important lorsque la température de fixation augmente. En effet, 80% de TBO est libéré en 6 heures pour une température de thermofixation de 160°C (72 heures pour une température de 150°C) dans le cas de la PMβCD.

Dans notre étude, la cinétique de libération du TBO dans le PBS est plus lente et donc plus intéressante dans le cas d'un traitement du CoCr-PDA avec le PMβCD à 150°C ou le PβCD à 140°C. La quantité totale de TBO adsorbée est quant à elle équivalente (Figure 72).

a

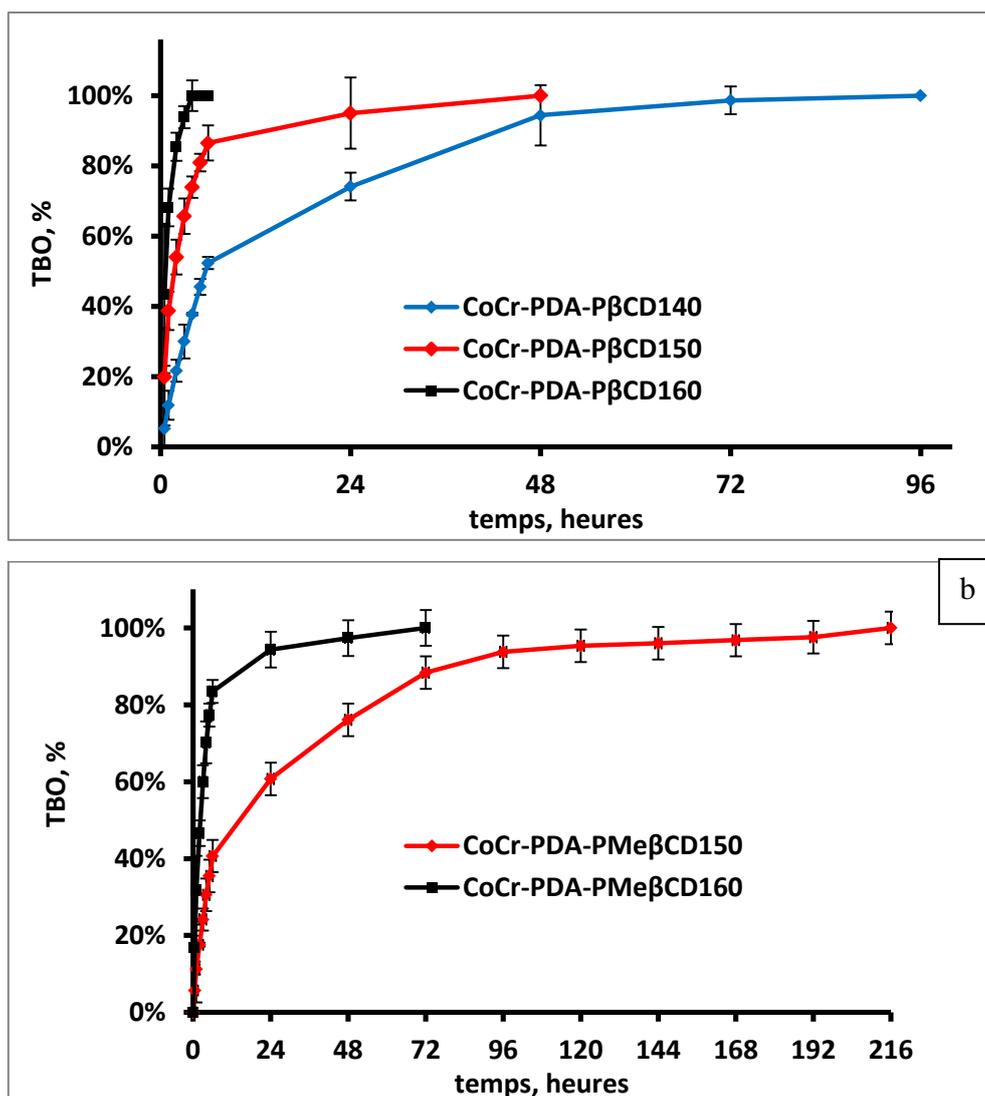


Figure 72 - Influence de la température de polycondensation de la PβCD (a) et PMeβCD (b) sur la cinétique de libération du TBO dans le PBS (temps de fixation 30 minutes)

Le temps de fixation, arbitrairement fixé à 30 minutes dans l'étude précédente a été optimisé avec les paramètres de température suivants : 150°C pour la PMeβCD et 140°C pour la PβCD. Plusieurs temps de traitement ont été évalués (20, 30, 45 et 60 minutes) afin de définir les paramètres optimaux permettant de charger une quantité maximale de TBO et de limiter l'effet « burst ».

Les Figure 73 et Figure 74 montrent que la durée optimale de polycondensation est de 30 minutes pour les 2 CDs étudiées (PβCD et PMeβCD) avec une quantité maximale de TBO adsorbée respectivement de 869 nmol/cm² et de 641 nmol/cm² pour les pastilles de CoCr fonctionnalisées avec le PMeβCD et le PβCD. Les profils de libération montrent également

des résultats en faveur d'un traitement thermique fixé à 30 minutes ; l'effet « burst » semble effectivement limité.

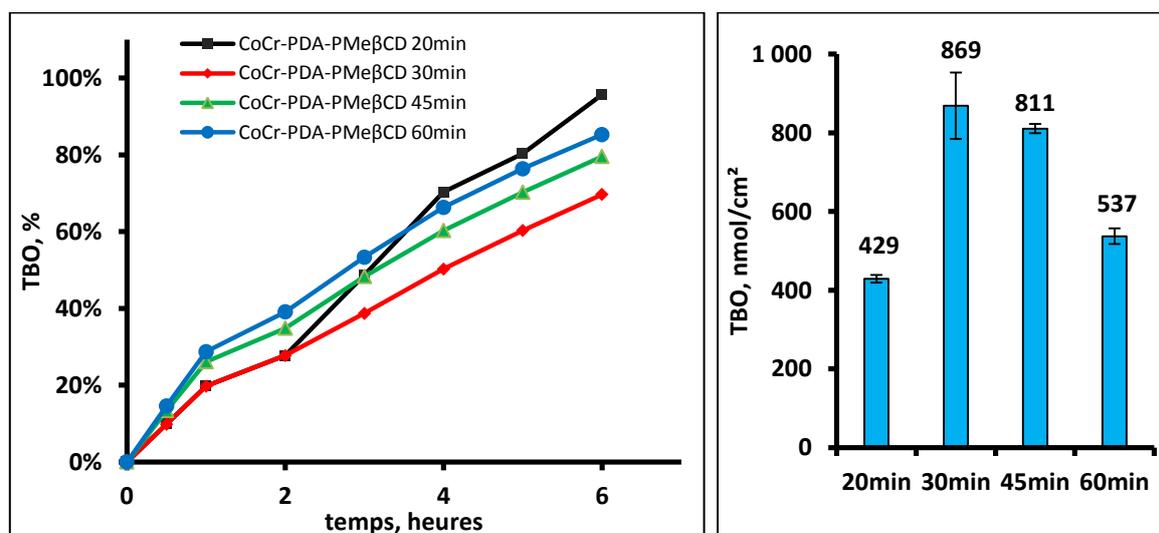


Figure 73 – Influence du temps de la polycondensation à 150°C de PMeβCD des pastilles de CoCr sur les 6 premières heures de libération (gauche) de TBO dans PBS ; Influence du temps de la polycondensation sur la quantification finale (droite) de TBO

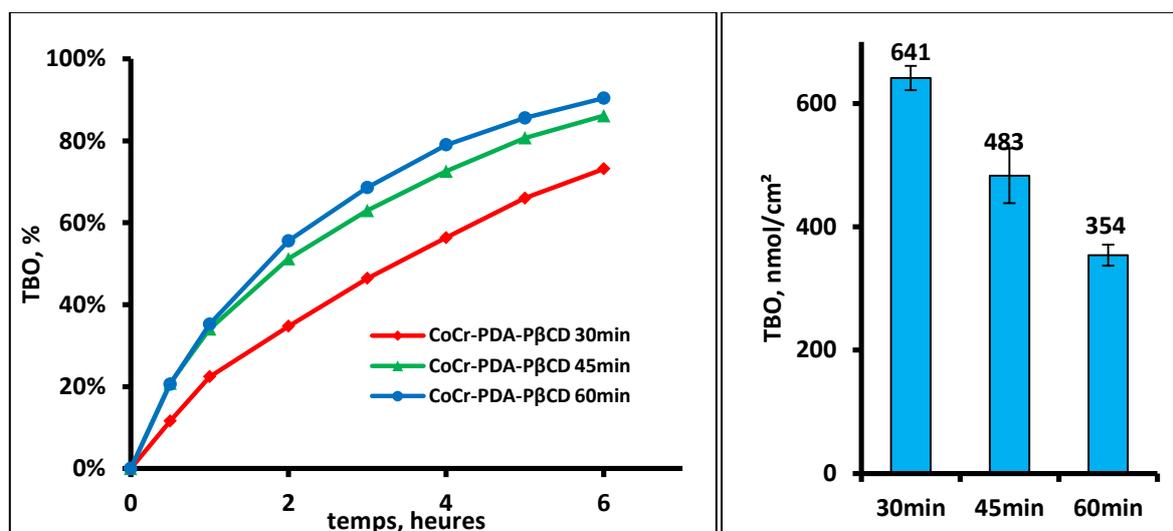


Figure 74 - Influence du temps de la polycondensation à 140°C de PβCD des pastilles de CoCr sur les 6 premières heures de libération (gauche) de TBO dans PBS ; Influence du temps de la polycondensation sur la quantification finale (droite) de TBO

Ce résultat s'explique par le mécanisme de la réaction de polycondensation des PCD (PMeβCD et PβCD) qui est progressif³⁷⁸ : une première étape jusqu'à la 30^{ème} minute, correspondant à la polymérisation progressive des CDs sur le support et donc une augmentation de la quantité de PCD, jusqu'à consommation complète des réactifs en présence. Ceci se traduit par une quantité de TBO adsorbée plus élevée. La deuxième étape,

comprise entre la 30^{ème} et la 60^{ème} minute, implique une réaction de réticulation du PCD entre les OH de la CD et des groupes carboxyliques résultant de la polycondensation. Cette étape a pour conséquence la diminution progressive des fonctions carboxyliques disponibles capables d'interagir avec le TBO. De plus, le réseau tridimensionnel devient plus dense, limitant ainsi la pénétration du TBO au cœur du polymère. Dans les deux cas, la quantité de TBO adsorbée et l'effet « burst » optimaux sont obtenus pour un temps de polycondensation de 30 minutes.

Dans cette étude, 2 CDs ont été retenues compte tenu des travaux antérieurs concernant l'application des CD dans la libération prolongée de molécule thérapeutique^{210, 379} : la β CD et la Me β CD. L'étape de polycondensation a pu être optimisée pour la P β CD (140°C, 30 min) et la PMe β CD (150°C, 30 min). Toutefois, le PMe β CD montre de meilleures performances en termes de quantités de TBO chargées et de temps de libération comme le montre la Figure 75 reprenant les résultats obtenus avec les paramètres optimisés.

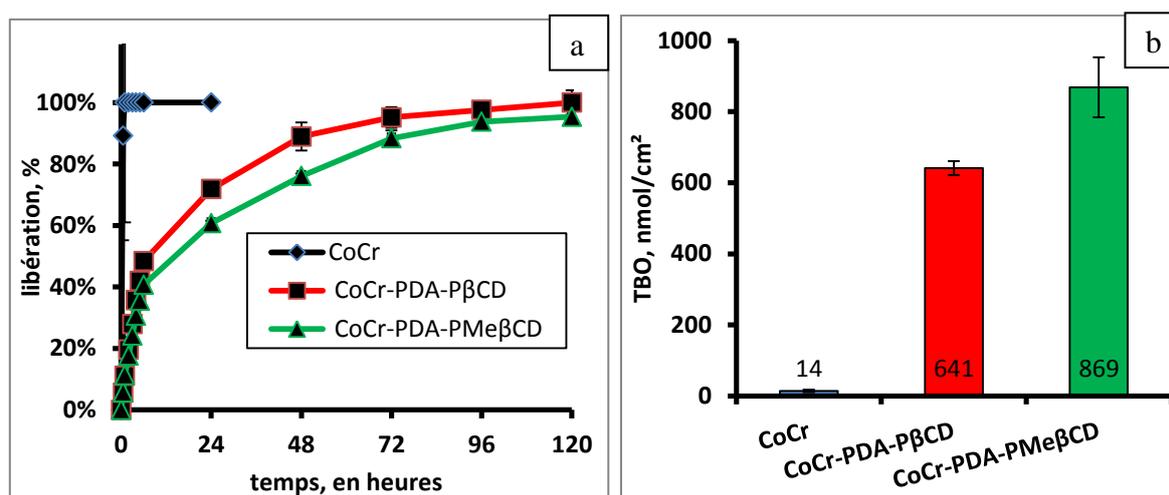


Figure 75 - Cinétique de libération (a) et quantité (b) de TBO adsorbé sur des pastilles de CoCr fonctionnalisées par le P β CD ou par le PMe β CD.

Les résultats présentés sur la Figure 75 montrent que les pastilles fonctionnalisées adsorbent 30 à 50 fois plus de TBO que les pastilles vierges selon la nature de la cyclodextrine. Les pastilles fonctionnalisées avec la Me β CD absorbent 1,5 fois plus de TBO que les pastilles fonctionnalisées avec la β CD. La Me β CD présente en moyenne 3,5 groupements méthyles (DS=0,5), ce qui modifie légèrement la forme de la cavité de la cyclodextrine en la rendant plus hydrophobe que la β CD. Cette caractéristique permet a priori à cette cyclodextrine une meilleure interaction avec les molécules de TBO comparée à la β CD (interactions hydrophobes plus importantes) avec une libération plus longue dans le temps.

Le greffage de la seconde couche de PCD sur les pastilles de CoCr-PDA se fera comme suit :

- Imprégnation dans une solution CTR/NaH₂PO₂/Me β CD (10/3/10)
- Séchage 90°C pendant 10 minutes
- Fixation à 150°C pendant 30 minutes.

4.2.2.2.2. Influence du rinçage sur le revêtement

Les dispositifs médicaux fonctionnalisés avec les CDs suivent une étape de neutralisation des fonctions acides carboxyliques résiduelles et de lavage pour éliminer toute trace de réactifs. Cette étape permet en outre d'améliorer la cyto-compatibilité du revêtement de PCD³⁸⁰

Suite au procédé de fonctionnalisation, les pastilles de CoCr-PDA-PCD ont été rincées par simple immersion dans de l'eau ultra-pure, puis ont subi une étape de neutralisation au Na₂CO₃ et une étape de lavage au Soxhlet. La neutralisation dans le carbonate de sodium ne montre aucun effet de dégradation visible du revêtement et la quantité de TBO adsorbée reste identique avant et après traitement (~695 nmol/cm²) (Figure 76). Le rinçage au Soxhlet (2 cycles de Soxhlet, 150 minutes environ) ne montre pas visuellement de dégradation du revêtement (Figure 76). Par contre, la quantité de TBO adsorbée est 2 fois plus importante après ce traitement (1125±11,25 nmol/cm² vs 694±12,3 nmol/mm²) (Figure 76). En effet, la réaction conduisant à l'obtention du PCD est une estérification réversible. Ainsi, la présence d'eau et d'une température élevée favorisent l'hydrolyse du PCD, ce qui a pour conséquence une augmentation significative du nombre de fonctions carboxyliques et par conséquent un « relâchement » du réseau tridimensionnel du PCD permettant des interactions plus importantes avec le TBO. Le lavage par extraction Soxhlet sera donc appliqué à la fin du procédé de fonctionnalisation.

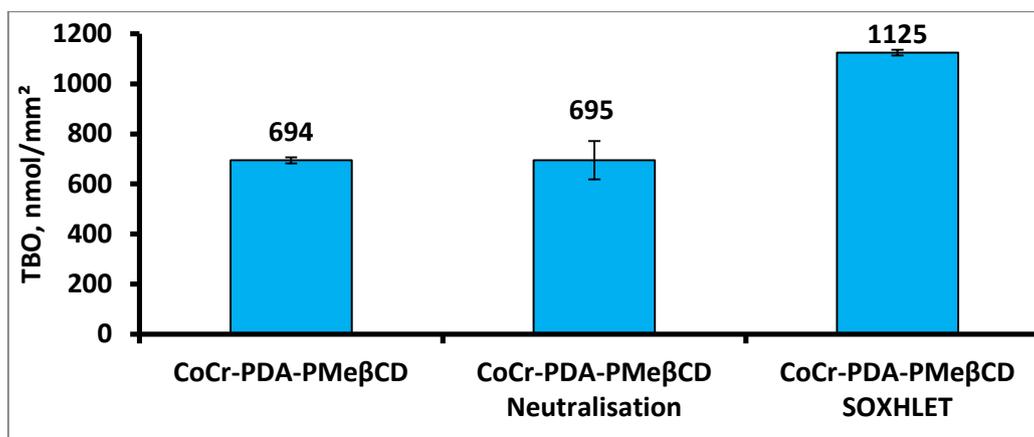


Figure 76 - Quantité de TBO adsorbée sur les échantillons de CoCr-PDA-PCD neutralisées par le carbonate de sodium ou lavées par extraction au Soxhlet

4.2.2.2.3. Conclusion

L'ensemble des investigations présentées ci-dessus a permis d'optimiser les paramètres de fonctionnalisation du CoCr par un polymère à base de cyclodextrine. Ces étapes de fonctionnalisation ont été également évaluées sur le plan biologique dans la suite de cette étude.

4.2.2.3. Caractérisation des pastilles de CoCr-PDA-PMe β CD

4.2.2.3.1. Microscopie Electronique à Balayage

La morphologie des couches de PDA et de PDA-PMe β CD a été analysée par MEB. Cette étude montre clairement la présence d'une couche de PDA très dense greffée sur le CoCr. L'épaisseur de la couche de PDA, après rainurage de la surface de CoCr-PDA par une pointe de téflon a pu être évaluée à 70 nm. Les quelques particules présentes en surface à fort grossissement sont expliquées par la formation de particules de PDA lors du processus de réticulation.

Cette épaisseur de PDA est supérieure à celle retrouvée dans la littérature pour ce type de support ³⁷⁵, mais reste comparable à celle mesurée sur le silicium ³⁷⁶. En effet, Le procédé d'oxydation du CoCr favorisant l'interaction avec les catéchols de la dopamine et le recuit imposé à la PDA sont deux facteurs pouvant expliquer l'obtention d'une couche plus dense et plus épaisse.

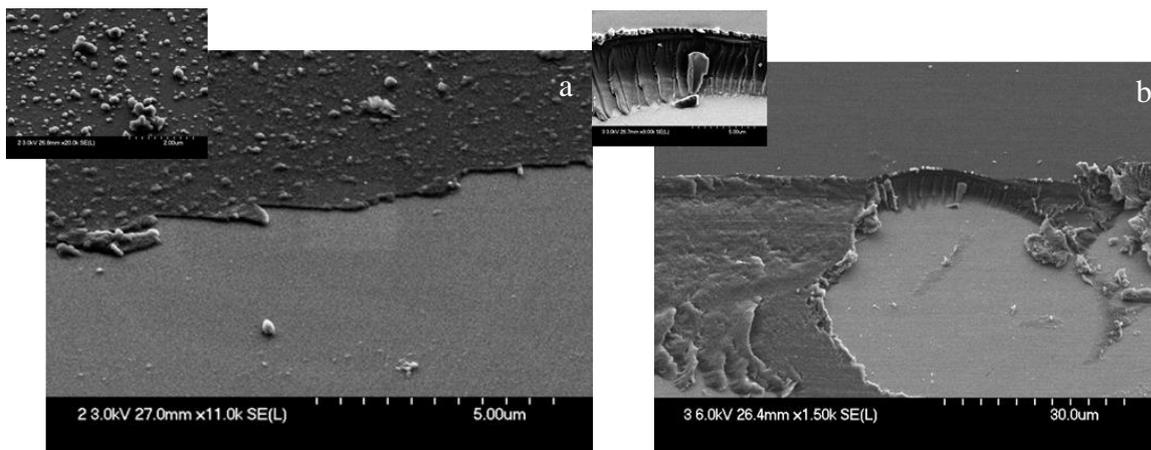


Figure 77 - Images MEB du CoCr-PDA(a) et du CoCr-PDA-PCD (b) avec une rainure réalisée avec une pointe téflonnée pour estimer l'épaisseur de ce revêtement

En ce qui concerne le revêtement obtenu par fonctionnalisation du P $\text{Me}\beta\text{CD}$ sur le CoCr-PDA (Figure 78b), une couche dense et très homogène de polymère a pu être observée. L'épaisseur de cette couche a pu être déterminée par MEB, en utilisant le même procédé de rayure que précédemment. Une épaisseur de 5,7 μm a été évaluée.

Une observation de la surface de stents de CoCr fonctionnalisés par ce même procédé de greffage a également pu être réalisée (Figure 78).

L'analyse MEB met en évidence la présence d'un revêtement rugueux dans le cas du stent fonctionnalisé par la PDA, et d'un revêtement lisse et homogène sur toute la surface du stent dans le cas du stent fonctionnalisé par le PDA-P $\text{Me}\beta\text{CD}$. Aucune craquelure de la couche de polymère n'a pu être observée.

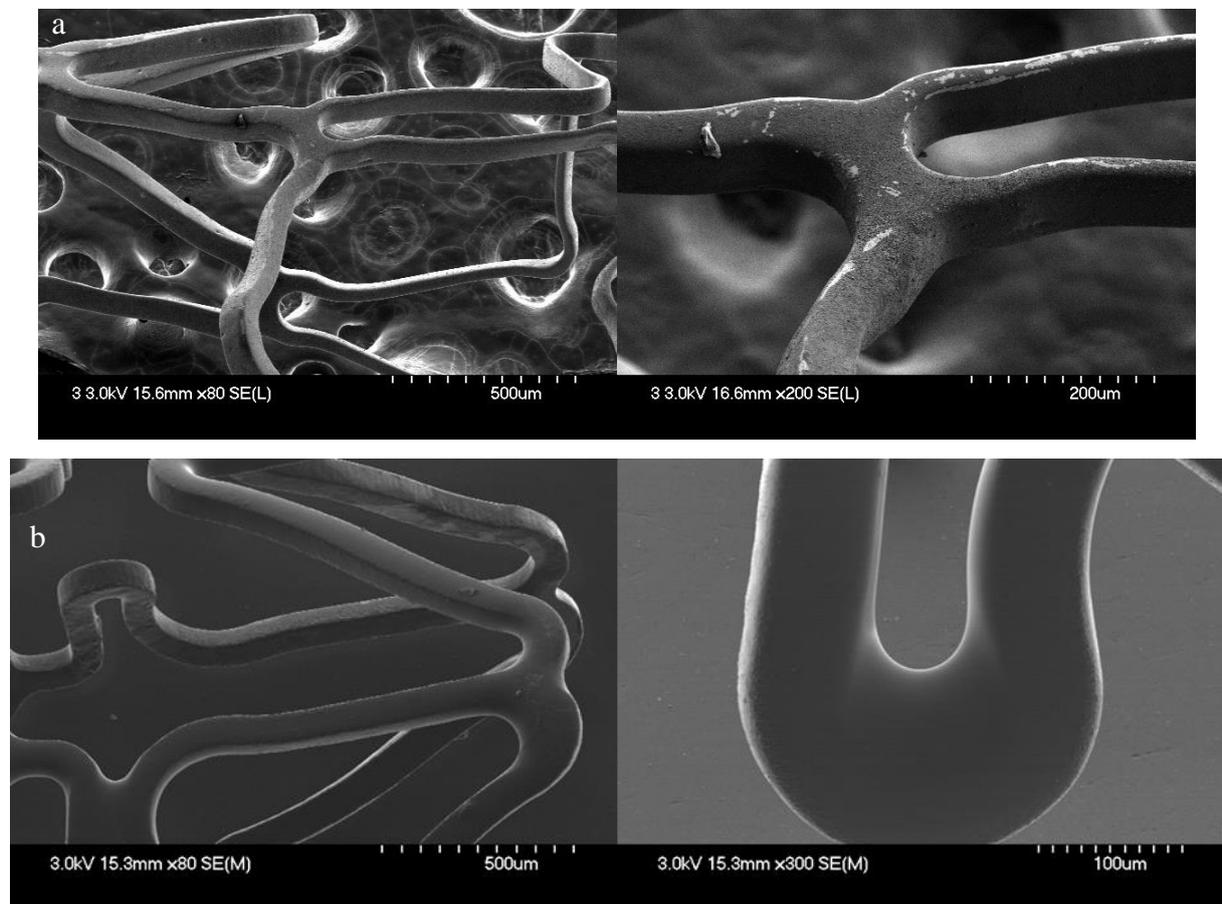


Figure 78 - photos MEB du stent CoCr après fonctionnalisation par PDA (a) et PDA-P $\text{Me}\beta\text{CD}$ (b)

4.2.2.3.2. Ellipsométrie

Des analyses d'ellipsométrie ont permis de confirmer l'épaisseur de la couche de PDA formée sur l'échantillon de CoCr puisqu'une épaisseur de 86nm a pu être mesurée, ce qui est proche des valeurs obtenues par MEB. Malheureusement, l'analyse des surfaces fonctionnalisées par PDA-PM β CD n'a pas été possible en raison d'un phénomène de dispersion de la lumière observé avec les échantillons fonctionnalisés avec le PCD.

4.2.2.3.3. Dégradation dans le milieu de culture

L'étude de la dégradation du revêtement dans le PBS (pH 7.4) et dans le milieu de culture cellulaire (MEM de Eagle, Eurobio), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio) a été effectuée sur des pastilles de CoCr fonctionnalisées par PDA-PM β CD.

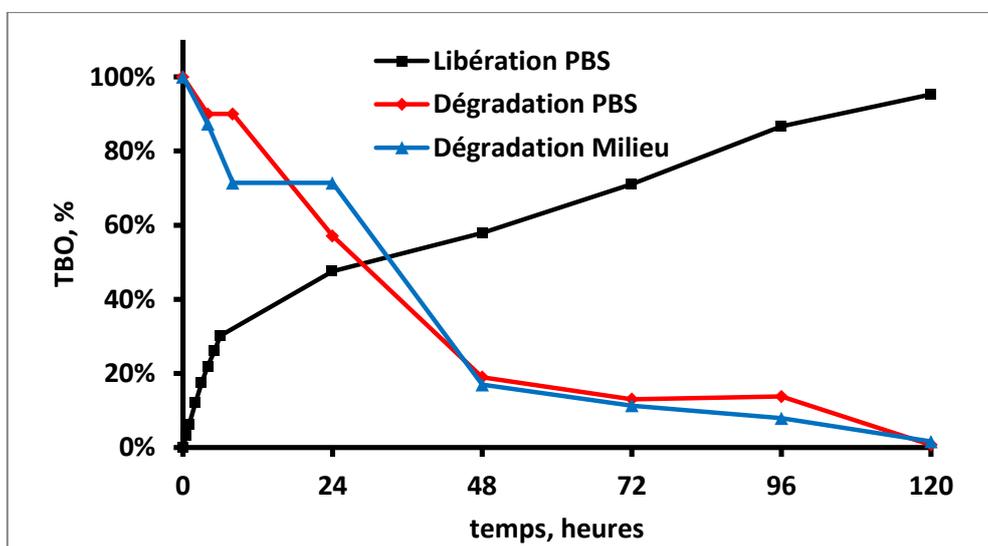


Figure 79 - Etude de la dégradation du PCD greffé sur un échantillon de CoCr-PDA dans le milieu de culture et dans le PBS en comparaison avec la cinétique de libération du TBO dans le PBS

Après retraits réguliers de pastilles fonctionnalisées immergées dans le milieu de culture ou le PBS, la dégradation du PCD a pu être évaluée par un dosage TBO. La Figure 79 montre que la quantité de TBO adsorbée sur les pastilles chute brutalement après 2 jours passés dans le milieu de culture ou dans le PBS; ceci laisse suggérer que la quasi-totalité du revêtement PCD est décroché de la surface métallique. Ces résultats sont intimement liés aux cinétiques de libération observées, avec un effet « burst » important au cours des 48 premières heures (Figure 75). Le mécanisme de libération du TBO de la surface de CoCr-PDA-PCD est donc essentiellement lié à une dégradation du PCD plutôt qu'à une diffusion du TBO au travers le PCD.

4.2.2.4. Evaluations biologiques

4.2.2.4.1. Viabilité cellulaire

L'étude de la viabilité cellulaire réalisée avec les cellules épithéliales L132 (ATCC-CCL5) répond aux standards européens et internationaux des dispositifs médicaux implantables. Les polymères de PDA, PMe β CD et PDA-PMe β CD ont été synthétisés dans un réacteur spécifique afin d'obtenir une poudre de chacun des polymères utilisés. La toxicité de ces poudres a été testée par la méthode du clonage en préparant des concentrations croissantes d'échantillons dans le milieu de culture en présence de cellules. La Figure 80 montre les résultats obtenus après 9 jours d'incubation, où la ligne à 50% représente la concentration létale. Tout comme pour la dopamine (testée dans le chapitre précédent), la PDA présente une cytotoxicité dès la plus faible concentration testée (25 μ g/ml) ; malgré la polymérisation, les fonctions catéchols non consommées restent toxiques. Le PCD ne présente quant à lui aucune cytotoxicité avec un taux de survie des cellules L132 de 77% à 400 μ g/ml. Lorsque le PDA et le PCD sont « co-polymérisés », une cytotoxicité n'apparaît qu'à partir de la concentration la plus élevée (400 μ g/mL). Cette cytotoxicité est attribuable à la présence de groupes catéchols dans le polymère. Sur le dispositif médical final, ces groupes seront théoriquement immobilisés sur la surface de l'implant métallique et ne devraient pas induire de cytotoxicité.

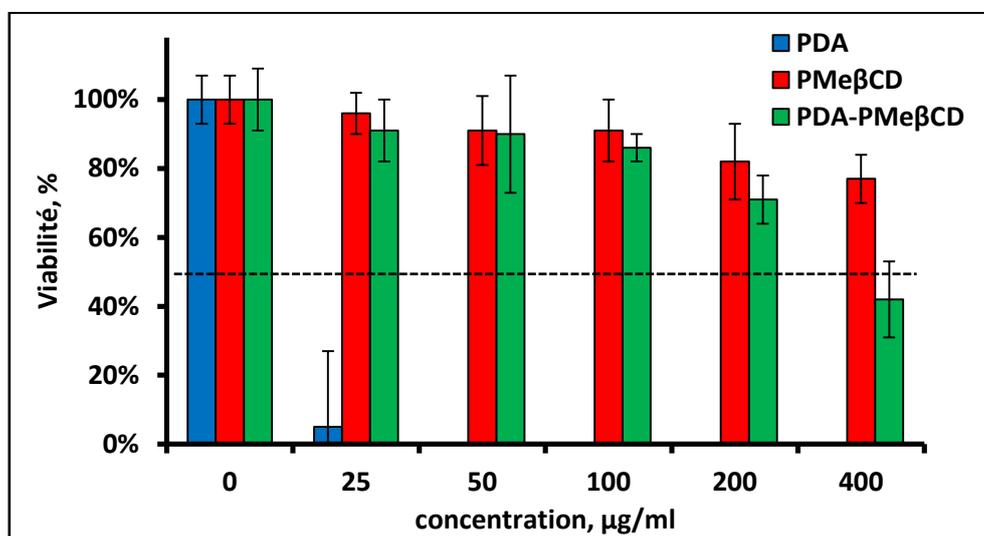


Figure 80 - Viabilité des cellules L132 en contact pendant 9 jours avec les poudres de PDA, PMe β CD et de PDA-PMe β CD

4.2.2.4.2. Vitalité et prolifération cellulaires

Afin de valider l'innocuité du revêtement, les échantillons de CoCr-PDA-PCD ont été préparés et la cytocompatibilité a été étudiée à chaque étape du procédé de fonctionnalisation.

La cytocompatibilité a été évaluée par des tests de vitalité et prolifération des cellules HPMEC (annexe 1).

La Figure 81 et la Figure 82 montrent une très bonne cytocompatibilité des échantillons de CoCr et de CoCr oxydé par le piranha avec des taux de vitalité et de prolifération supérieurs à 80 et 90%, après 3 et 6 jours respectivement. Ce résultat suggère que l'étape de rinçage répétée et prolongée (4 bains US d'eau ultra-pure de 30 minutes chacun) après oxydation a permis de nettoyer correctement les échantillons et d'éliminer les produits résiduels (notamment les sulfites).

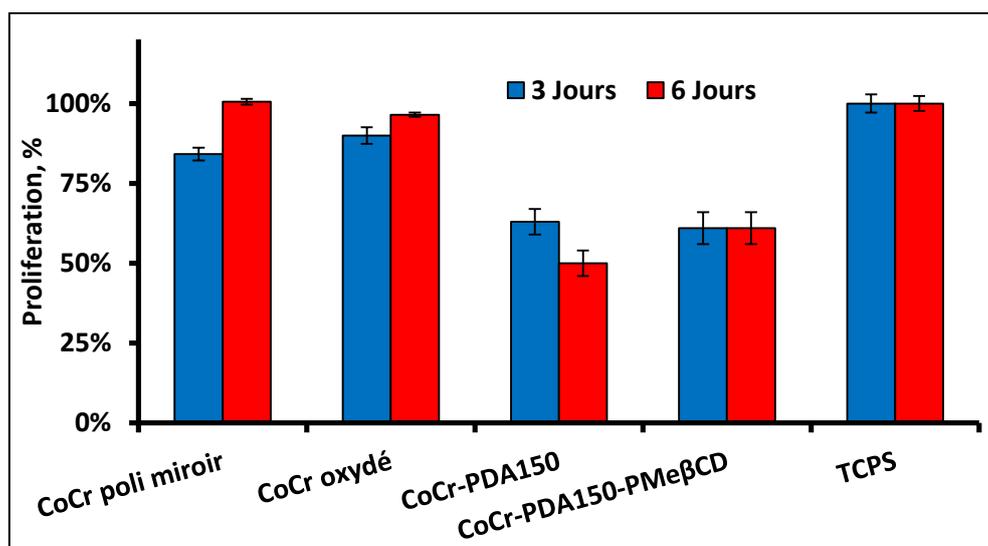


Figure 81 - Prolifération des cellules HPMEC au contact des échantillons de CoCr ; CoCr-PDA et CoCr-PDA-PCD après 3 et 6 jours d'incubation.

Concernant les pastilles fonctionnalisées par la PDA, les taux de prolifération et de vitalité décroissent après 6 jours à 50% et 62% respectivement. Pour les pastilles fonctionnalisées par le PDA-PmeβCD, ces taux atteignent après 6 jours, 61% et 50% respectivement. Concernant les pastilles fonctionnalisées par la PDA, la diminution de la prolifération/vitalité cellulaire pourrait s'expliquer, une nouvelle fois, par la présence de groupes catéchols résiduels dans le PDA qui n'ont pas été greffés sur le support métallique³⁸¹ ; et qui présentent une cytotoxicité connue²¹².

Concernant les échantillons CoCr-PDA-PCD, la diminution des taux de prolifération/vitalité cellulaires pourrait être expliquée par la dégradation progressive du PCD, qui va régénérer des fonctions carboxyliques et/ou attribuable encore une fois à la présence de fonctions catéchols résiduelles.

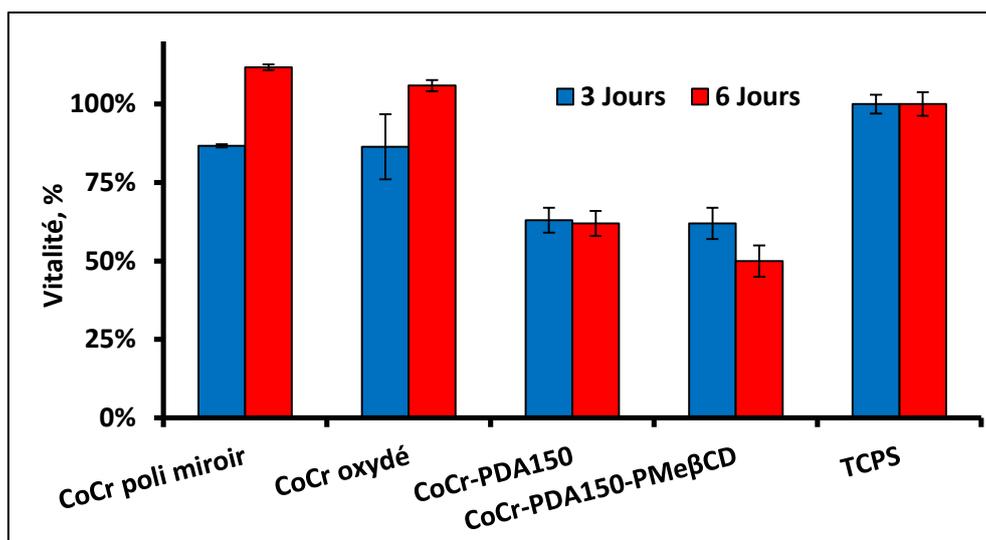


Figure 82 - Vitalité des cellules HPMEC au contact des échantillons de CoCr ; CoCr-PDA et CoCr-PDA-PCD après 3 et 6 jours d'incubation.

Enfin, la décroissance des taux de prolifération des cellules HPMEC après le 3^{ème} jour est probablement liée au décrochage et à la remise en solution dans le milieu de culture du revêtement comportant la PDA et le PMeβCD.

Les conditions *in vivo* sont moins drastiques que les conditions *in vitro* appliquée ici sans remplacement du milieu de culture pendant 6 jours, permettant une accumulation de polymère comportant des fonctions carboxyliques ou catéchols dans le milieu. Les conditions *in vivo* s'affranchissent de ce problème avec le flux sanguin renouvelant rapidement le milieu.

4.2.2.4.3. Hémolysse

L'étude du caractère hémolytique des échantillons de CoCr, CoCr-PDA et CoCr-PDA-PCD a permis d'écarter leur potentiel hémolytique ; l'index calculé était de 0 correspondant au témoin négatif (PBS).

4.2.2.5. Etudes des interactions entre le Principe Actif et le CoCr-PDA-PCD

4.2.2.5.1. Etude avec le Paclitaxel

Le paclitaxel (PTX) est un agent immunosuppresseur et antiprolifératif utilisé initialement dans les chimiothérapies anti-cancéreuses. Comme cela a été expliqué dans la première partie de ce travail, l'analogie des mécanismes initialement décrits dans le phénomène de resténose a été faite avec la croissance cellulaire anarchique d'un processus tumoral; c'est donc naturellement que le PTX a été proposé pour tenter de limiter ce phénomène. Il fait partie des molécules de choix dans la problématique de resténose et a été utilisé comme référence dans

notre modèle d'étude. La complexation des CD avec le PTX a déjà été largement étudiée^{382, 383} et notamment avec la Me β CD³⁸⁴⁻³⁸⁶.

Dans cette étude, nous avons évalué l'interaction entre le PTX et le PCD indépendamment du support métallique. La Figure 84 montre le diagramme de solubilité du PTX avec la Me β CD et le PMe β CD. Comme attendu, la faible solubilité dans l'eau du PTX (0,7 mg/l) a été significativement augmentée en présence de concentration croissante de Me β CD et de PMe β CD. Ainsi la solubilité du PTX a été multipliée d'un facteur 180 (140mg/l) et d'un facteur 90 (60mg/l) respectivement dans une solution de 50 g/l de Me β CD et de PMe β CD.

Il est à noter que le polymère de cyclodextrine comporte un ratio en poids de 50% de Me β CD pour 50% de CTR²¹⁴, ce qui explique le pouvoir de solubilisation 2 fois inférieur par rapport à la Me β CD observé dans la Figure 84.

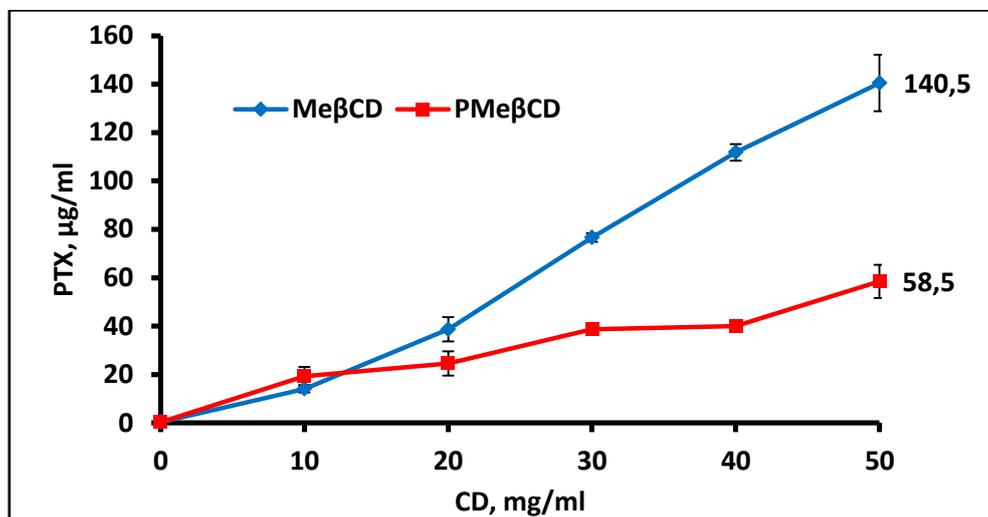


Figure 83 - Diagramme de solubilité du PTX en présence de Me β CD et de PMe β CD

Le diagramme de solubilité du PTX confirme l'interaction avec la Me β CD, mais également avec le PMe β CD; la réticulation de la Me β CD avec le CTR n'a pas modifié ses capacités à former des complexes d'inclusion avec le PTX.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'interaction entre le CoCr-PDA-PCD et le PTX et notamment sur sa capacité à adsorber et libérer le PTX. Après chargement des pastilles dans une solution éthanoïque 70% à 1g/L et 10g/L, la quantité de PTX adsorbée a été évaluée par HPLC. La concentration moyenne de PTX adsorbé sur le CoCr-PDA-PCD était de 0,56 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($\pm 0,13$) et 8,77 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ ($\pm 1,38$) pour des concentrations d'imprégnation respectives de 1g/L et 10g/L. La quantité de PTX adsorbée sur les stents pourra donc être modulée de 0,6

à 9 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ en ajustant la concentration de la solution d'imprégnation de PTX. Nous avons sélectionné la concentration la plus élevée de 10 g/L pour la suite des manipulations.

L'aspect le plus pertinent dans l'évaluation de l'impact du revêtement repose sur l'étude de la cinétique de libération du PTX. Pour évaluer l'intérêt du revêtement polymérique sur la cinétique de libération, nous avons déposé une quantité équivalente de PTX (8,77 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$) sur les pastilles de CoCr et CoCr-PDA-PMe β CD qui ont ensuite été placées dans 3 mL de plasma humain frais. Le PTX, est une molécule lipophile qui sur cette simple propriété peut s'adsorber sur un grand nombre de substrat métallique, tel le CoCr ou le NiTiNOL. C'est là aussi le principe même du concept de « polymer-free » développé par Dake et al. sur le stent ¹⁴³.

La Figure 85 montre la quantité restante de PTX sur les pastilles en fonction du temps de séjour dans le plasma humain. Les résultats montrent une diminution rapide dès la première heure de libération de la quantité de PTX restante sur le CoCr (127 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ soit 91% du PTX libéré) ; elle est toutefois limitée sur le CoCr-PDA-PMe β CD à 71% soit 414 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ de PTX restant sur l'échantillon. Le polymère permet donc de ralentir la libération du PTX ; ainsi le PTX est totalement élué du support CoCr non fonctionnalisé en 2 heures alors qu'il est toujours présent, en faible quantité, au-delà de 24 heures sur le CoCr-PDA-PCD.

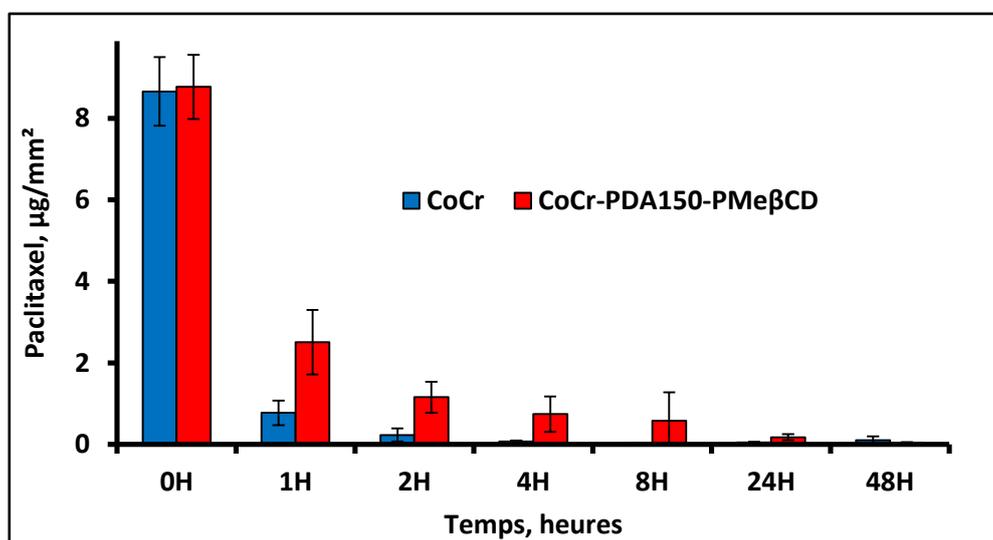


Figure 84 - Evaluation de la quantité restante de Paclitaxel sur le CoCr et sur le CoCr fonctionnalisé par PDA-PMe β CD (\varnothing 14.5 mm) après différents temps de libération dans le plasma humain à 37°C sous agitation douce (80rpm)

Les résultats obtenus avec le PTX sur le support CoCr non fonctionnalisé sont en corrélation avec les résultats du “polymer-free” appliqué au stent à libération de médicament dans un modèle animal. Leur étude était réalisée sur du NiTiInol¹⁴³.

Nous pouvons donc penser qu’un stent métallique fonctionnalisé avec le PDA-PM β CD aura la capacité de prolonger la libération de PTX.

4.2.2.5.2. Etude avec la simvastatine

La simvastatine fait, comme son nom l’indique, partie de la famille des statines. Elle est commercialisée en France sous le nom de Zocor® (MSD FRANCE, Courbevoie, France) ou de Lodalés® (Sanofi Winthrop Industrie, Ambares, France). C’est une lactone inactive, qui est métabolisée dans le foie en forme bêta-hydroxyacide active, douée entre autre d’une puissante activité inhibitrice de l’HMG Co-A réductase (3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase). Nous avons souhaité démontrer son intérêt dans la resténose intra-stent, car elle possède des propriétés intéressantes pour limiter le phénomène de resténose. Sa sélectivité vis-à-vis des cellules endothéliales et des cellules musculaires a été évaluée *in vitro*³⁸⁷.

La Figure 85 montre l’effet de la concentration de simvastatine sur la vitalité des cellules endothéliales de types HAEC (pour Human Aortic Endothelial Cells) et des cellules musculaires lisses. Les cellules musculaires lisses sont plus sensibles à la simvastatine que les cellules endothéliales. Ainsi, la vitalité des cellules musculaires lisses diminue de 50% lorsqu’elles sont en présence d’une concentration de 1000 nM de simvastatine, alors qu’il faut atteindre une concentration de 5000 nM pour obtenir une telle diminution de la vitalité des cellules endothéliales ; cet effet était recherché. En effet, dans le phénomène de resténose, les molécules antiprolifératives de type PTX ou sirolimus n’ont pas d’action cellulaire ciblée. Elles limitent les phénomènes de prolifération à la fois des cellules musculaires lisses, limitant la resténose mais également des cellules endothéliales, limitant la ré-endothélialisation et la cicatrisation de la paroi artérielle responsable de thrombose artérielle tardive.

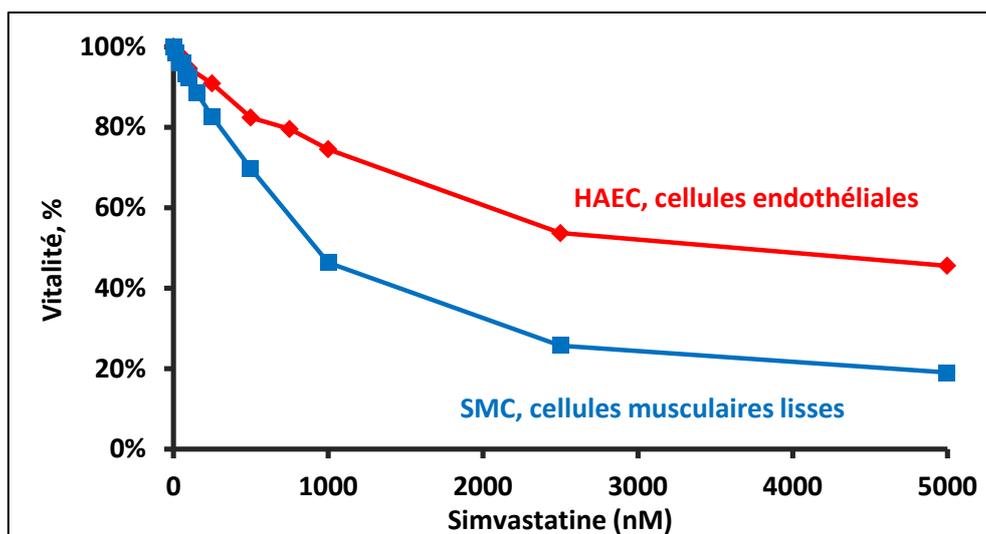


Figure 85 - Vitalité des cellules endothéliales et musculaires lisses en fonction de concentrations croissantes de simvastatine

L'interaction entre la simvastatine et la Me β CD a été évaluée en spectrophotométrie-UV pour déterminer la constante de complexation par la méthode de Benesi-Hildebrand. La Figure 86a montre un effet hyperchrome lors de l'ajout progressif de cyclodextrine dans une solution de concentration constante de simvastatine, ce qui prouve une interaction entre simvastatine et Me β CD. L'application de la loi de Benesi-Hildebrand (Figure 86b) permet de calculer une constante de complexation proche de 900 M⁻¹ ($r^2=0,9741$).

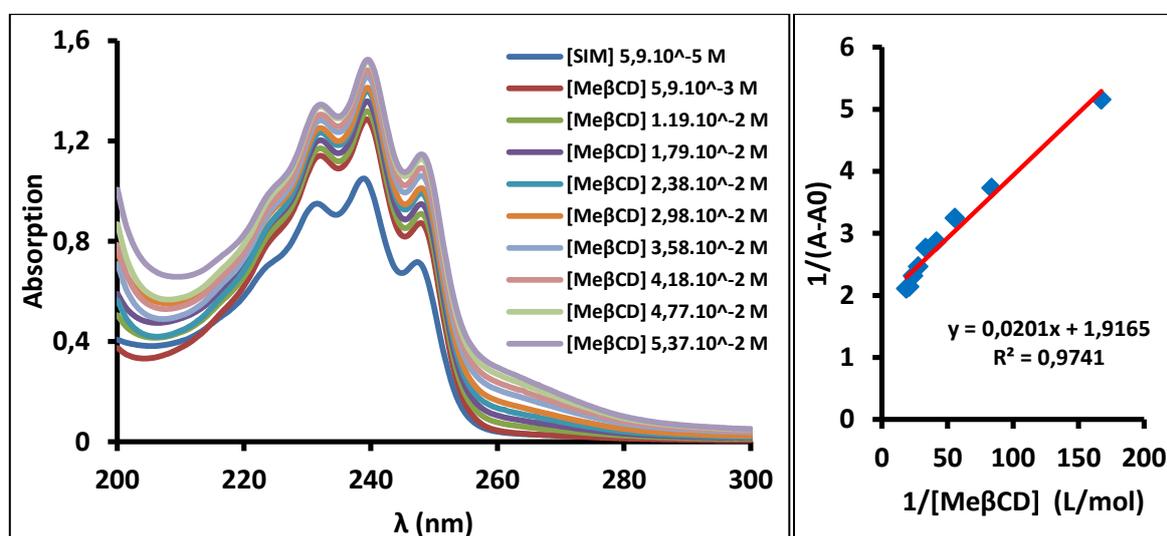


Figure 86 - Etude de l'interaction simvastatine/Me β CD par spectrophotométrie UV-Vis et détermination de la constante de complexation par la méthode de Benesi-Hildebrand.

Comme pour le paclitaxel, l'interaction entre le polymère de cyclodextrine (PMe β CD) et la simvastatine a été évaluée. La Figure 87 présente le diagramme de solubilité de la simvastatine en présence de Me β CD et de PMe β CD. La solubilité de la simvastatine

augmente de manière proportionnelle en fonction de la concentration de Me β CD et de PMe β CD mise en solution. Le rapport entre Me β CD et PMe β CD reste toutefois bien inférieur à 2 (1,48).

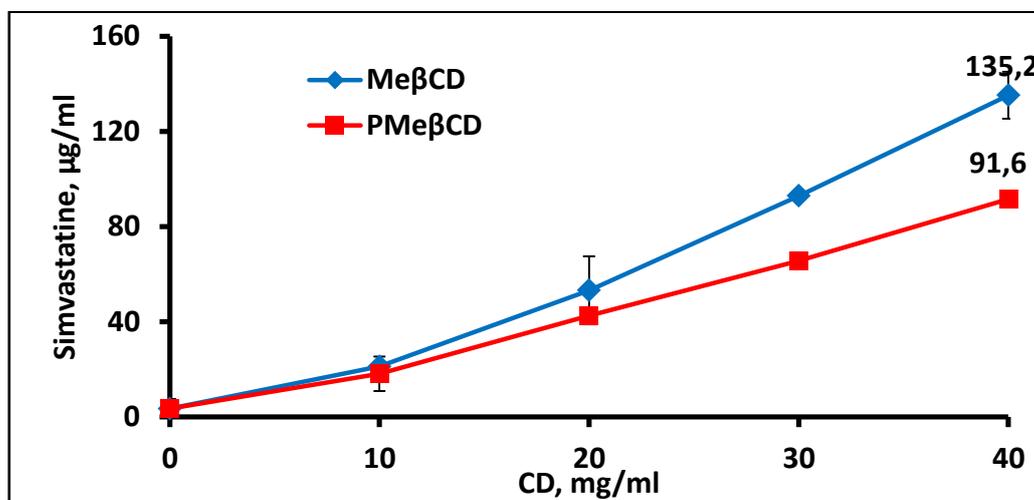


Figure 87 - Evolution de la solubilité de la simvastatine dans l'eau lors de l'augmentation de la concentration de Me β CD et du PMe β CD

Comme pour le PTX, nous avons évalué le potentiel de la couche de PDA-PMe β CD greffée sur la pastille de CoCr à être chargée par la simvastatine.

L'augmentation de la concentration en solution de simvastatine de 1 à 10 g/L se traduit par une augmentation de la quantité de simvastatine chargée sur les pastilles fonctionnalisées comme cela était le cas avec le PTX ; de 0,34 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ à une concentration de simvastatine de 1g/L à 1,44 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ pour une concentration de simvastatine de 10g/L.

L'évaluation de la libération de simvastatine dans le plasma depuis la plateforme de CoCr fonctionnalisée par PDA-PMe β CD a permis d'observer une libération de simvastatine sur 72 heures après dosage par HPLC (Figure 88). Ces résultats objectivent le rôle du revêtement dans sa capacité à ralentir la libération de molécule thérapeutique en milieu biologique.

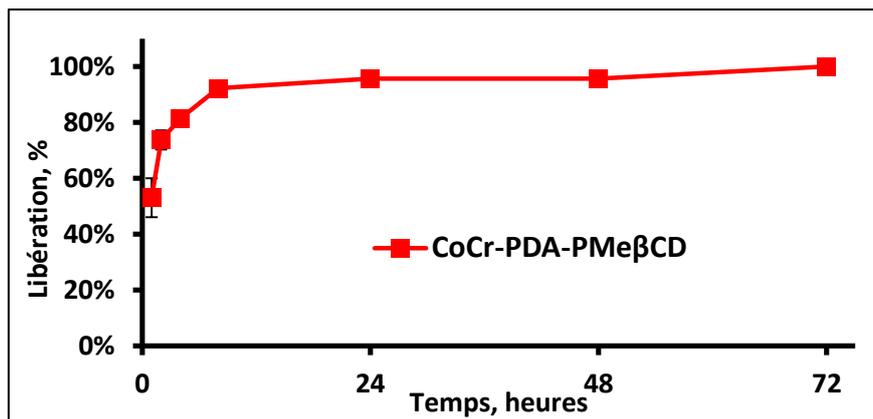


Figure 88 - étude la cinétique de libération dans le plasma de la simvastatine depuis des pastilles de CoCr fonctionnalisées par PDA-P Me β CD

4.2.2.6. Implantation chez l'animal

À l'heure actuelle, aucune évaluation *in vitro* n'est capable de reproduire les conditions pour analyser avec fiabilité la resténose artérielle. L'expérimentation animale est une étape indispensable pour la validation du procédé de fonctionnalisation.

Les stents fonctionnalisés (CoCr-PDA-PCD) ont été chargés avec la simvastatine (10 g/L) et le PTX (10 g/L). Les stents nus (Presillion plus, Cordis, J&J) et le stent actif (Cypher, Cordis, J&J) ont été utilisés comme référence pour valider le modèle et positionner notre produit par rapport au marché. La Figure 89 correspond à l'analyse histo-morphométrique des groupes contrôles, avec sur la partie gauche de l'image, une coupe transversale à 28 jours de l'aorte traitée par un stent CoCr nu avec un ratio néointima/média de 1,18 et sur la droite de l'image une coupe transversale à 28 jours d'aorte de rat traitée par un stent CoCr enduit de sirolimus avec un ratio néointima/média de 0,52.

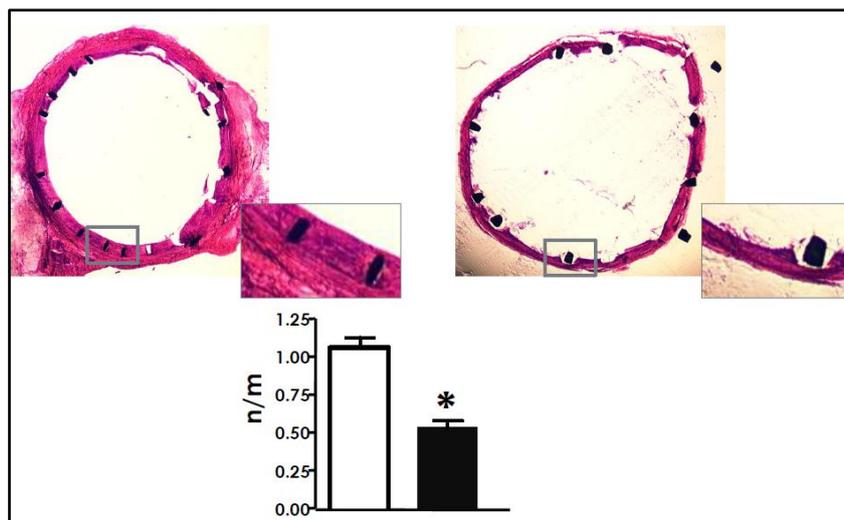


Figure 89 - Analyse histo-morphométrique à 28 jours d'une aorte de rat traitée par un stent nu (gauche de l'image) et par un stent actif coronaire actuellement sur le marché (droite de l'image) ; le ratio de l'épaisseur de la néointima et de la média est évaluée à 1,18 pour le stent nu et 0,52 pour le stent actif

Dans notre étude, tous les rats étaient vivants après les 28 jours et ont été sacrifiés pour analyser les segments artériels traités par l'implantation d'un stent. L'analyse histo-morphométrique a mis en évidence des résultats comparables pour le groupe CoCr-PDA-PMe β CD/PTX par rapport à ce qui est recensé avec les stents enduits d'agents immunoprolifératifs actuellement sur le marché. Le ratio pour le groupe traité par stent CoCr-PDA-PMe β CD/simvastatine était de 0,29 et donc à un niveau de resténose bien inférieur par rapport au groupe contrôle (Figure 90).



Figure 90 - Ratio néointima/média des différents groupes de rat traités par stents CoCr nus, stents CoCr actif sur le marché, CoCr PDA-PMe β CD PTX et Simvastatine. Coupe transversale et vue macroscopique pour analyse histo-morphométrique d'aorte de rat explantée au 28^{ème} jour suivant le traitement par un stent CoCr fonctionnalisé par PDA-PMe β CD et imprégné de PTX (sur la gauche de l'image) ou imprégné de simvastatine (sur la droite de l'image)

Ces premières données sont actuellement en cours de vérification avec une étude incluant plus d'individus, ainsi que des groupes contrôles incluant les stents non chargés de simvastatine

et/ou de PTX, et avec le revêtement correspondant à chacune des étapes du procédé de fonctionnalisation (PDA et PDA-PM β CD).

4.3. Discussion et conclusion

L'optimisation du procédé de fonctionnalisation a permis d'améliorer les propriétés du support pour qu'il puisse répondre aux exigences d'un dispositif médical. Il a ainsi pu être démontré et objectivé que le revêtement proposé permet d'augmenter les capacités d'absorption de diverses molécules thérapeutiques comme le PTX et la simvastatine à la surface du support métallique. De plus, l'universalité de ce système permettra d'inclure potentiellement de nouvelles molécules thérapeutiques ayant un rôle pertinent dans la problématique de resténose/thrombose après angioplastie.

Le point critique de ce travail consistait à greffer solidement le revêtement de polycyclodextrine sur la surface des pastilles de CoCr et surtout de transférer cette méthode de fonctionnalisation vers la modification chimique de stents vasculaires. Ce verrou technologique a pu être levé grâce à l'utilisation de la polydopamine, un polymère hautement adhésif qui permet d'ancrer de manière covalente le PCD par l'intermédiaire de la formation de liaisons amides.

Ainsi, grâce principalement à des méthodes de quantifications colorimétriques permettant d'évaluer le greffage de la PDA d'une part (acide orange) et le greffage du polyCD d'autre part (TBO), le procédé de fonctionnalisation en 2 étapes a pu être développé, optimisé et transféré vers les stents.

L'ensemble des matériaux résultant du processus de fonctionnalisation ont été caractérisés par des analyses de microscopie électronique à balayage qui révèlent que les revêtements obtenus sont denses et surtout homogènes, ce qui est très important pour notre application. L'innocuité du revêtement proposé a été démontré par l'intermédiaire de tests de cytocompatibilité ce qui permet d'envisager l'application de ces nouveaux stents fonctionnalisés en pratique clinique. Les premiers tests *in vivo* réalisés sur des rats ont montré une inhibition significative de la resténose intra-stent en utilisant des stents coatés par la PCD et chargés en simvastatine.

Néanmoins, le revêtement reste pour l'heure, relativement fragile en milieu physiologique ; la cinétique de libération des agents thérapeutiques étant guidée par le processus de dégradation du revêtement dans ce milieu. Toutefois, l'intérêt de cette nouvelle génération de stent a pu être démontré. En effet, les travaux de Dake présentant les résultats cliniques du stent en NiTiNOL Zilver® PTX « polymer-free » et communiqués lors du récent congrès « Vascular

Interventional Advances (VIVA) meeting » (390), semblent offrir des suites au stenting fémoral superficielle plus favorables que pour les patients traités par un simple stent nu. Le point intéressant que Dake suggère dans cette problématique de la resténose/thrombose n'est pas dans la quantité de molécule thérapeutique que l'on rend disponible au contact du flux sanguin, mais plus probablement dans la nature de la molécule thérapeutique en contact avec les éléments constituant la paroi vasculaire qui influence la réponse cellulaire. Ainsi, l'universalité du système PDA-PCD greffé sur surface est très intéressante dans cette optique. Ces hypothèses devraient pouvoir être objectivées grâce à une série de tests *in vivo* réalisés sur des rats implantés par ces nouveaux dispositifs chargés avec diverses molécules thérapeutiques.

5. Discussion générale - Perspectives

Dans ce travail, nous avons mis au point deux plateformes de fonctionnalisation différentes sur stent en utilisant comme base commune entre ces deux systèmes une ancre chimique à base de dopamine. Dans le premier chapitre, des polymères parfaitement définis comportant en bout de chaîne le motif dopamine et en chaîne latérale l'unité glucosamine ont été élaborés par polymérisation radicalaire contrôlée RAFT et immobilisés sur titane en utilisant la stratégie de greffage « graft to ». L'immobilisation de la glucosamine n'a malheureusement pas apporté les résultats escomptés dans la problématique cardio-vasculaire initialement posée car les polymères de glucosamine n'ont pas montré de sélectivité vis-à-vis des cellules endothéliales comme cela avait été reporté dans la littérature ³¹⁴. Néanmoins, les excellents résultats en termes de cytocompatibilité vis-à-vis des cellules ostéoblastiques permettent d'envisager une application biomédicale de ce dispositif en chirurgie orthopédique ou maxillo-faciale. Toutefois, la poursuite de ce travail a permis de mettre au point une méthode de greffage utilisant un dérivé de la dopamine fonctionnalisée avec une molécule de biotine permettant l'immobilisation d'une molécule anti-thrombotique sur le titane (molécule EP224283 ³⁸⁸, inhibiteur des anti-GPIIb/IIIa, Laboratoires Endotis Pharma) via la formation du complexe avidine-biotine. La cytocompatibilité de ce revêtement a été validée sur cellules HPMEC et son efficacité dans la problématique de resténose reste à évaluer. De plus, le greffage sur support métallique de l'hémine (inducteur de l'hème oxygénase-1, ³⁸⁹) via l'ancre dopamine est en cours d'étude. Dans le chapitre 2, nous avons développé un système de libération prolongée de molécules thérapeutiques basé sur le greffage d'un polymère réservoir de cyclodextrines. Cette immobilisation a été rendue possible par l'utilisation d'un polymère biomimétique hautement adhésif à base de polydopamine. Après optimisation du greffage de ce système sur CoCr, la cytocompatibilité du revêtement polymère a été démontrée et des études cinétiques ont révélé la capacité de ce système à libérer de manière prolongée le TBO, le PTX et la simvastatine durant plusieurs jours, à la fois dans le PBS mais aussi dans le plasma humain. Les premières implantations de stents fonctionnalisés par ce procédé et chargés soit en PTX, soit en simvastatine, dans le modèle de resténose développé chez le rat nous a permis d'obtenir, pour le groupe de stents PTX, des résultats similaires aux données de la littérature sur les stents chargés d'agents anti-prolifératifs ^{390, 391}. Il est ici très intéressant de noter que les résultats sur la resténose pour le groupe de rat où le stent était fonctionnalisé par le PDA-PCD et chargé de simvastatine ont permis d'obtenir une réduction plus importante du phénomène d'hyperplasie myointimale (par rapport aux autres groupes : stent nu et stent

PDA-PCD-PTX). Dans le modèle que nous avons présenté, la quantité initiale de simvastatine chargée était de $2,3 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ et se montre dépendante de la concentration initiale de la solution d'imprégnation de simvastatine. Dans la littérature, une seule étude comparant un stent fonctionnalisé par un polymère biocompatible (triflusal)³⁹² chargé de simvastatine avec un stent nu et un stent à l'everolimus a été proposée¹⁹⁰; le stent chargé de $0,4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ de simvastatine n'a pas montré, dans cette étude, de supériorité par rapport au stent nu. Ces excellents résultats sur la resténose seront à confronter avec une série de tests similaires réalisés à partir de stents témoins fonctionnalisés uniquement par la polydopamine et par le couple polydopamine-polymère de CD, sans molécule thérapeutique.

En effet, un effet intrinsèque des polymères de PDA et/ou PCD pourrait expliquer la supériorité de ces résultats, dans la mesure où il a été présenté dans le chapitre précédant, le rôle de la polydopamine vis-à-vis des cellules endothéliales³⁹³. La cohorte de rat actuellement en cours devrait nous permettre d'obtenir ces réponses.

En parallèle à cette expérimentation animale, qui requiert une logistique assez lourde, avec une reproductibilité pas toujours stable pour de raisons multifactorielles, un modèle *ex vivo*, sous la forme d'un bioréacteur a été mis au point au sein de notre unité³⁹⁴. Il a été conçu pour tester des dispositifs endovasculaires dans des conditions hémodynamiques proches des conditions physiologiques. Il est particulièrement bien adapté à l'évaluation de nouveaux stents fonctionnalisés, en complément du modèle animal, en permettant de réaliser de multiples prélèvements tissulaires ou liquidiens, ainsi que de travailler avec du tissu artériel humain ou animal (Figure 91).

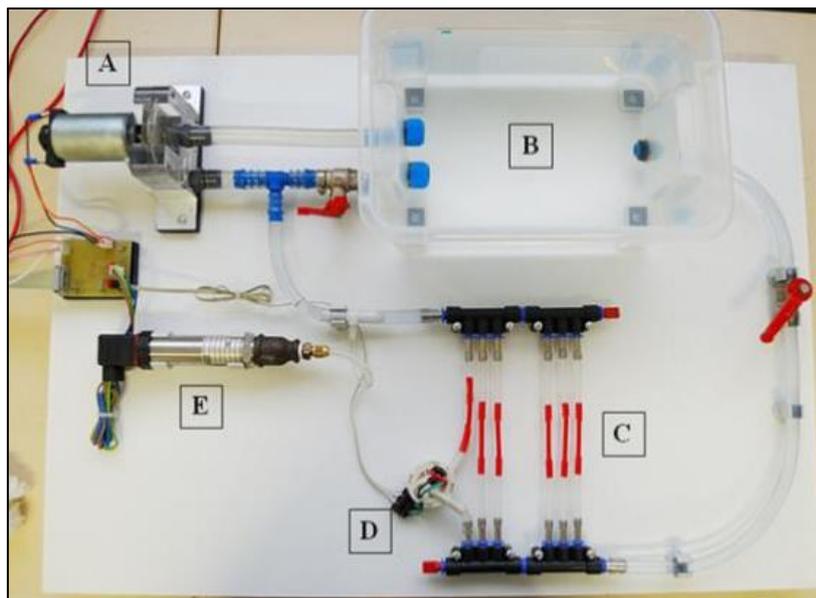


Figure 91 - Modèle de bioréacteur développé en partenariat avec l'ENSAM-Paris au cours des travaux de thèse de B Maurel. Le bioréacteur est constitué d'une pompe centrifuge (A), d'un réservoir (B), d'artère (silicone ou de aorte de rat prélevée) (C), d'un débitmètre (D) et d'un capteur de pressions (E)

Par ailleurs, dans le but de prolonger la libération d'agents thérapeutiques du système associant polydopamine et polymères de cyclodextrines, un système multi-couche produit par un empilement de bicouches interagissant entre elles par liaisons électro-statiques a été évalué sur le titane. L'ancrage initial au support métallique est assuré par la polydopamine sur laquelle vient se greffer une couche de polymère anionique à base de cyclodextrines comme exposé ci-dessus. A partir de cette première couche anionique, une succession de couches de polyélectrolytes constituées d'un polymère de chitosan cationique (polysaccharide cationique issu de la dégradation des crustacés) d'une part et du polymère de cyclodextrine anionique d'autre part, sont déposées sur le support en utilisant le principe L-b-L (layer by layer). Plusieurs épaisseurs de bicouches (une bicouche= 1 couche de chitosan + 1 couche de PCD) ont été testées : 0,5 qui correspond à une couche polydopamine-polymère de CD, puis 5, 10 et 15 bicouches. La molécule thérapeutique ou la molécule permettant l'évaluation du modèle (ici le TBO) a été chargée une fois le système multicouche généré, puis des cinétiques de libération ont été enregistrées (Figure 92 et Figure 93).

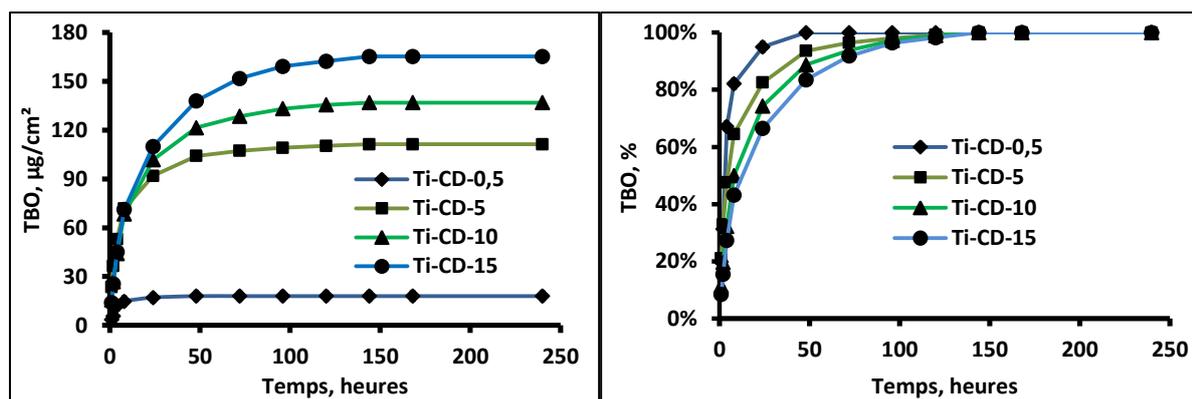


Figure 92 - Cinétique de libération en % et valeur absolue du TBO dans PBS à partir du système multicouche (0,5 ; 5 ; 10 et 15 bicouches)

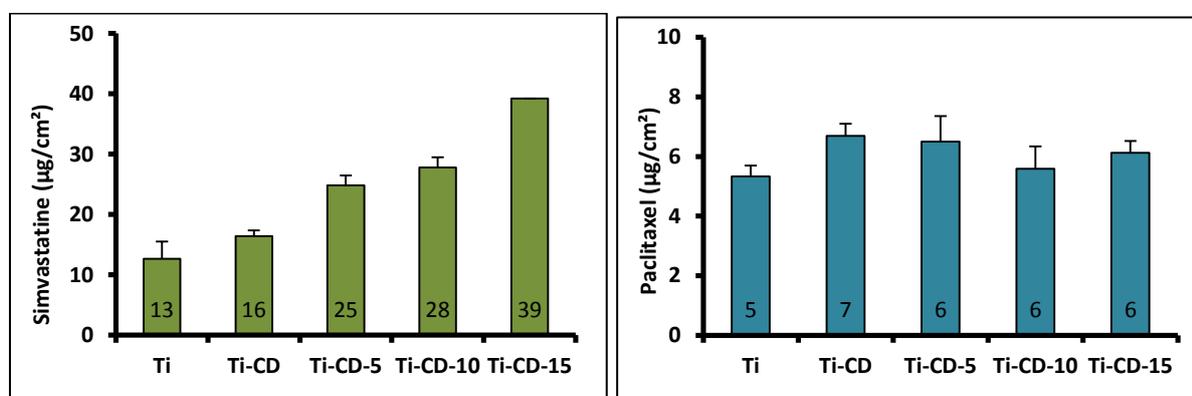


Figure 93 - Quantité de simvastatine et paclitaxel chargée dans le système multicouche

Les résultats obtenus avec le TBO, petite molécule cationique, et complexant avec la cyclodextrine, ont été les plus intéressants avec une adsorption améliorée et une libération prolongée en fonction du nombre de couche du système.

La simvastatine, petite molécule non chargée complexant avec la CD, montre également une adsorption améliorée en fonction du nombre de couche. Néanmoins, la quantité adsorbée reste inférieure, quel que soit le nombre de couche par rapport à celle obtenue avec le TBO.

Le paclitaxel, grosse molécule non chargée complexant avec la CD, montre une adsorption améliorée pour la première couche comparativement au titane nu (non fonctionnalisé), mais aucune amélioration n'est observée en utilisant un nombre de couche supérieur.

Le système multicouche permet donc ici d'obtenir un effet réservoir et une libération prolongée uniquement avec les molécules de TBO et de simvastatine.

Ainsi, le système multicouche permet de moduler la quantité de molécule thérapeutique absorbée sur le support et de prolonger les cinétiques de libération.

Dans le phénomène de resténose, la quantité nécessaire de molécule thérapeutique ainsi que la durée d'action sélective sur SMC (cellules musculaires lisses) et cellules endothéliales reste cependant pour le moment inconnue. On sait que la majeure partie de la réponse cellulaire se fait dans les 28 premiers jours suivant le traumatisme endovasculaire ³⁹⁵. Ces résultats seront également à valider d'une part à partir du modèle animal, mais également par l'intermédiaire du bioréacteur. La suite de ces travaux sera menée au cours des masters de recherche d'Adrien Hertault (2013-2014) et de Florent Briffa (2014-2015), que j'encadrerai.

6. Références bibliographiques

1. Classification of atherosclerotic lesions; report of a study group. *World Health Organization technical report series* 1958; **57**(143): 1-20.
2. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, 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. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1995; **15**(9): 1512-31.
3. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; **407**(6801): 233-41.
4. Hsueh WA, Anderson PW. Hypertension, the endothelial cell, and the vascular complications of diabetes mellitus. *Hypertension* 1992; **20**(2): 253-63.
5. 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**(11): 1305-12.
6. Luscher TF. The endothelium and cardiovascular disease--a complex relation. *The New England journal of medicine* 1994; **330**(15): 1081-3.
7. Takasaki I, Chobanian AV, Brecher P. Biosynthesis of fibronectin by rabbit aorta. *The Journal of biological chemistry* 1991; **266**(26): 17686-94.
8. 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.
9. Heart Protection Study Collaborative G. MRC/BHF Heart Protection Study of antioxidant vitamin supplementation in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; **360**(9326): 23-33.
10. Blann AD, Landray MJ, Lip GY. ABC of antithrombotic therapy: An overview of antithrombotic therapy. *Bmj* 2002; **325**(7367): 762-5.
11. Braunwald E, Domanski MJ, Fowler SE, et al. Angiotensin-converting-enzyme inhibition in stable coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2004; **351**(20): 2058-68.
12. Cid Dos Santos J. Rapport sur la désobstruction des thromboses artérielles anciennes. *Mem Acad chir* 1947; **73**: 409.
13. Capdevilla C, Alsac J, Julia P, Fabiani J. Artériopathies mésentériques. In: Elsevier, editor. *Encyclopédie Médico-chirurgicale*; 2013.
14. Oudot J. [Vascular grafting in thromboses of the aortic bifurcation]. *La Presse médicale* 1951; **59**(12): 234-6.
15. De Bakey ME, Cooley DA, Crawford ES, Morris GC, Jr. Clinical application of a new flexible knitted dacron arterial substitute. *The American surgeon* 1958; **24**(12): 862-9.
16. Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous saphenous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstructions. *Journal of vascular surgery* 1986; **3**(1): 104-14.
17. Clagett GP, Valentine RJ, Hagino RT. Autogenous aortoiliac/femoral reconstruction from superficial femoral-popliteal veins: feasibility and durability. *Journal of vascular surgery* 1997; **25**(2): 255-66; discussion 67-70.
18. de Vries SO, Hunink MG. Results of aortic bifurcation grafts for aortoiliac occlusive disease: a meta-analysis. *Journal of vascular surgery* 1997; **26**(4): 558-69.
19. Bandyk DF. Vascular surgical site infection: risk factors and preventive measures. *Seminars in vascular surgery* 2008; **21**(3): 119-23.

20. Copeland GP, Edwards P, Wilcox A, Wake PN, Harris PL. GORA: a scoring system for the quantification of risk of graft occlusion. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 1994; **76**(2): 132-5.
21. Williams GM. Complications of vascular surgery. *The Surgical clinics of North America* 1993; **73**(2): 323-35.
22. Dotter CT, Rosch J, Judkins MP. Transluminal dilatation of atherosclerotic stenosis. *Surgery, gynecology & obstetrics* 1968; **127**(4): 794-804.
23. Gruntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *The New England journal of medicine* 1979; **301**(2): 61-8.
24. Freiman DB, Ring EJ, Oleaga JA, Berkowitz H, Roberts B. Transluminal angioplasty of the iliac, femoral, and popliteal arteries. *Radiology* 1979; **132**(2): 285-8.
25. Castaneda-Zuniga WR, Formanek A, Tadarthy M, et al. The mechanism of balloon angioplasty. *Radiology* 1980; **135**(3): 565-71.
26. Holmes DR, Jr., Vlietstra RE, Smith HC, et al. Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *The American journal of cardiology* 1984; **53**(12): 77C-81C.
27. Dotter CT. Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery. *Investigative radiology* 1969; **4**(5): 329-32.
28. 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**(1): 261-3.
29. Dotter CT, Buschmann RW, McKinney MK, Rosch J. Transluminal expandable nitinol coil stent grafting: preliminary report. *Radiology* 1983; **147**(1): 259-60.
30. Maas DH, Stein B, Metzger H. PO₂ and pH measurements within the rabbit oviduct following tubal microsurgery: reanastomosis of previously dissected tubes. *Advances in experimental medicine and biology* 1984; **169**: 561-70.
31. Palmaz JC, Sibbitt RR, Reuter SR, Tio FO, Rice WJ. Expandable intraluminal graft: a preliminary study. Work in progress. *Radiology* 1985; **156**(1): 73-7.
32. 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**(12): 701-6.
33. Wright KC, Wallace S, Charnsangavej C, Carrasco CH, Gianturco C. Percutaneous endovascular stents: an experimental evaluation. *Radiology* 1985; **156**(1): 69-72.
34. Palmaz JC, Windeler SA, Garcia F, Tio FO, Sibbitt RR, Reuter SR. Atherosclerotic rabbit aortas: expandable intraluminal grafting. *Radiology* 1986; **160**(3): 723-6.
35. Rousseau H, Puel J, Joffre F, et al. Self-expanding endovascular prosthesis: an experimental study. *Radiology* 1987; **164**(3): 709-14.
36. Holmes DR, Jr., Savage M, LaBlanche JM, et al. Results of Prevention of REStenosis with Tranilast and its Outcomes (PRESTO) trial. *Circulation* 2002; **106**(10): 1243-50.
37. Ludgate SM, Potter DC. European directives on medical devices. *Bmj* 1993; **307**(6902): 459-60.
38. Palmaz JC. Balloon-expandable intravascular stent. *AJR American journal of roentgenology* 1988; **150**(6): 1263-9.
39. 10993-5 I. Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. 2009.
40. 10993-4 I. Biological evaluation of medical devices—Part 4: selection of tests for interactions with blood. 2002.

41. Baier RE, Dutton RC. Initial events in interactions of blood with a foreign surface. *Journal of biomedical materials research* 1969; **3**(1): 191-206.
42. DePalma VA, Baier RE, Ford JW, Gott VL, Furuse A. Investigation of three-surface properties of several metals and their relation to blood compatibility. *Journal of biomedical materials research* 1972; **6**(4): 37-75.
43. Balcon R, Beyar R, Chierchia S, et al. Recommendations on stent manufacture, implantation and utilization. Study Group of the Working Group on Coronary Circulation. *European heart journal* 1997; **18**(10): 1536-47.
44. Bosiers M, de Donato G, Deloose K, et al. Does free cell area influence the outcome in carotid artery stenting? *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2007; **33**(2): 135-41; discussion 42-3.
45. Timaran CH, Rosero EB, Higuera A, Ilarraza A, Modrall JG, Clagett GP. Randomized clinical trial of open-cell vs closed-cell stents for carotid stenting and effects of stent design on cerebral embolization. *Journal of vascular surgery* 2011; **54**(5): 1310-6 e1; discussion 6.
46. Matsumura JS, Yamanouchi D, Goldstein JA, et al. The United States Study for Evaluating Endovascular Treatments of Lesions in the Superficial Femoral Artery and Proximal Popliteal By using the Protege Everflex Nitinol Stent System II (DURABILITY II). *Journal of vascular surgery* 2013; **58**(1): 73-83 e1.
47. Scheinert D, Scheinert S, Sax J, et al. Prevalence and clinical impact of stent fractures after femoropopliteal stenting. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; **45**(2): 312-5.
48. Schmidt W, Wissgott C, Andresen R, Behrens P, Schmitz KP. Performance characteristics of modern self-expanding nitinol stents indicated for SFA. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin* 2011; **183**(9): 818-25.
49. Robertson SW, Ritchie RO. In vitro fatigue-crack growth and fracture toughness behavior of thin-walled superelastic Nitinol tube for endovascular stents: A basis for defining the effect of crack-like defects. *Biomaterials* 2007; **28**(4): 700-9.
50. Muller-Hulsbeck S, Schafer PJ, Charalambous N, Yagi H, Heller M, Jahnke T. Comparison of second-generation stents for application in the superficial femoral artery: an in vitro evaluation focusing on stent design. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists* 2010; **17**(6): 767-76.
51. Briguori C, Sarais C, Pagnotta P, et al. In-stent restenosis in small coronary arteries: impact of strut thickness. *Journal of the American College of Cardiology* 2002; **40**(3): 403-9.
52. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation* 2001; **103**(23): 2816-21.
53. Rogers C, Edelman ER. Endovascular stent design dictates experimental restenosis and thrombosis. *Circulation* 1995; **91**(12): 2995-3001.
54. Weissman NJ, Turco MA, Ormiston JA, et al. Improved strut coverage and less late incomplete apposition with thin-strut TAXUS Liberté vs. TAXUS Express: the importance of stent platform design for drug-eluting stents. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* 2011; **12**(4): 247-57.
55. He Y, Maehara A, Mintz GS, et al. Intravascular ultrasound assessment of cobalt chromium versus stainless steel drug-eluting stent expansion. *The American journal of cardiology* 2010; **105**(9): 1272-5.
56. Moreno R, Jimenez-Valero S, Sanchez-Recalde A, et al. Periprocedural (30-day) risk of myocardial infarction after drug-eluting coronary stent implantation: a meta-analysis comparing cobalt-chromium and stainless steel drug-eluting coronary stents. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2011; **6**(8): 1003-10.

57. Knittel D. *Encyclopaedia of Chemical Technology*: John Wiley and Sons; 1983.
58. Minkler WW, Baroch EF. The production of titanium, zirconium and hafnium. *Metallurgical Treatises*; 1981. p. 171–89.
59. Ikeshima T. Recent development in titanium sponge production,. In: *Technology ETSa*, editor. *Proceedings of the fifth international conference of titanium*; 1985; 1985. p. 3–14.
60. Gelas B, Armand M, Séraphin L, Tricot R. Titane et alliages de titane. *Techniques de l'ingénieur* 1976. p. 558.
61. Von Tengg-Kobligk H, Weber TF, Rengier F, et al. Imaging modalities for the thoracic aorta. *The Journal of cardiovascular surgery* 2008; **49**(4): 429-47.
62. Boyer RR. *Beta titanium alloys in the 1990's*. Warrendale; 1993.
63. Henriques VAR. Titanium production for aerospace applications. *Journal of Aerospace Technology and Management* 2009; **1**(1): 7-17.
64. NJC developing new technologies for joining titanium and its alloys. *Welding Journal* 2006; **85**(5): 41.
65. Liu X, Chu PK, Ding C. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 2004; **47**(3–4): 49-121.
66. Champin B, Gelas B. Traitement thermiques des alliages de titane. . *Techniques de l'ingénieur*; 1984. p. 1335.
67. Long M, Rack HJ. Titanium alloys in total joint replacement--a materials science perspective. *Biomaterials* 1998; **19**(18): 1621-39.
68. Wang K. The use of titanium for medical applications in the USA. *Materials Science and Engineering: A* 1996; **213**(1–2): 134-7.
69. Williams JS. Mechanical devices used for carotid stenting. *Techniques in Vascular and Interventional Radiology* 2000; **3**(2): 102-13.
70. Berman C. A case of severe compound fracture of the humerus treated with a vitallium plate. *Proc Transvaal Mine Med Off Assoc* 1945; **25**: 103.
71. Lide DR, editor. *Handbook of Chemistry and Physics*; 2009.
72. Reclaru L, Lerf R, Eschler PY, Meyer JM. Corrosion behavior of a welded stainless-steel orthopedic implant. *Biomaterials* 2001; **22**(3): 269-79.
73. Brugirard J. *Etude du comportement électrochimique des métaux et alliages dentaires*. Paris: Prélat Ed.; 1970. p. 282.
74. Lopič N, Jelen A, Vrtnik S, et al. Quantitative determination of magnetic force on a coronary stent in MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* 2013; **37**(2): 391-7.
75. *Endovascular Angioplasty Material's Catalog*. Euro PCR04; 2004.
76. Ponsin P. *Materials & Processes for medical devices conference*; 2004: ASM International; 2004.
77. Serruys PW, Kutryk MJ. *Handbook of coronary stents* Second edition. ed: Martin Dunitz. Ltd, ; 1998.
78. Stettler C, Wandel S, Allemann S, et al. Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis. *Lancet* 2007; **370**(9591): 937-48.
79. Cutlip DE, Baim DS, Ho KK, et al. Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. *Circulation* 2001; **103**(15): 1967-71.
80. Haude M, Erbel R, Hafner G, et al. [Multicenter results of coronary implantation of balloon expandable Palmaz-Schatz vascular stents]. *Zeitschrift fur Kardiologie* 1993; **82**(2): 77-86.
81. Barragan P, Sainsous J, Silvestri M, et al. [Pilot study of the efficacy of ticlopidine in early patency of coronary endoprostheses]. *Archives des maladies du coeur et des vaisseaux* 1994; **87**(11): 1431-7.

82. Kinoshita M, Matsumura S, Sueyoshi K, Ogawa S, Fukuda K. Randomized trial of statin administration for myocardial injury: is intensive lipid-lowering more beneficial than moderate lipid-lowering before percutaneous coronary intervention? *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2007; **71**(8): 1225-8.
83. Erbel R, Haude M, Hopp HW, et al. Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. Restenosis Stent Study Group. *The New England journal of medicine* 1998; **339**(23): 1672-8.
84. Lafont A, Guzman LA, Whitlow PL, Goormastic M, Cornhill JF, Chisolm GM. Restenosis after experimental angioplasty. Intimal, medial, and adventitial changes associated with constrictive remodeling. *Circulation research* 1995; **76**(6): 996-1002.
85. Post MJ, Borst C, Kuntz RE. The relative importance of arterial remodeling compared with intimal hyperplasia in lumen renarrowing after balloon angioplasty. A study in the normal rabbit and the hypercholesterolemic Yucatan micropig. *Circulation* 1994; **89**(6): 2816-21.
86. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, 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**(8): 496-501.
87. Urban P, Meier B, Finci L, de Bruyne B, Steffenino G, Rutishauser W. Coronary wedge pressure: a predictor of restenosis after coronary balloon angioplasty. *Journal of the American College of Cardiology* 1987; **10**(3): 504-9.
88. Klues HG, Radke PW, Hoffmann R, vom Dahl J. [Pathophysiology and therapeutic concepts in coronary restenosis]. *Herz* 1997; **22**(6): 322-34.
89. Ferns GA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models. *Int J Exp Pathol* 2000; **81**(2).
90. Moreno R, Fernandez C, Alfonso F, et al. Coronary stenting versus balloon angioplasty in small vessels: a meta-analysis from 11 randomized studies. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; **43**(11): 1964-72.
91. Zeller T, Rastan A, Schwarzwald U, et al. Treatment of in-stent restenosis following stent-supported renal artery angioplasty. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2007; **70**(3): 454-9.
92. Dick P, Wallner H, Sabeti S, et al. Balloon angioplasty versus stenting with nitinol stents in intermediate length superficial femoral artery lesions. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2009; **74**(7): 1090-5.
93. Steinbauer MG, Pfister K, Greindl M, et al. Alert for increased long-term follow-up after carotid artery stenting: results of a prospective, randomized, single-center trial of carotid artery stenting vs carotid endarterectomy. *Journal of vascular surgery* 2008; **48**(1): 93-8.
94. Gasparone A, Versaci F. Coronary stenting and inflammation. *The American journal of cardiology* 2005; **96**(12A): 65L-70L.
95. Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, et al. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *Journal of vascular surgery* 2007; **45 Suppl A**: A15-24.
96. Alfonso F, Zueco J, Cequier A, et al. A randomized comparison of repeat stenting with balloon angioplasty in patients with in-stent restenosis. *Journal of the American College of Cardiology* 2003; **42**(5): 796-805.
97. Laham RJ, Carrozza JP, Berger C, Cohen DJ, Kuntz RE, Baim DS. Long-term (4- to 6-year) outcome of Palmaz-Schatz stenting: paucity of late clinical stent-related problems. *Journal of the American College of Cardiology* 1996; **28**(4): 820-6.
98. Levine M, Gent M, Hirsh J, et al. A comparison of low-molecular-weight heparin administered primarily at home with unfractionated heparin administered in the hospital for

- proximal deep-vein thrombosis. *The New England journal of medicine* 1996; **334**(11): 677-81.
99. Stellbrink C, Nixdorff U, Hofmann T, et al. Safety and efficacy of enoxaparin compared with unfractionated heparin and oral anticoagulants for prevention of thromboembolic complications in cardioversion of nonvalvular atrial fibrillation: the Anticoagulation in Cardioversion using Enoxaparin (ACE) trial. *Circulation* 2004; **109**(8): 997-1003.
100. Denardo SJ, Davis KE, Reid PR, Tchong JE. Efficacy and safety of minimal dose (< or =1,000 units) unfractionated heparin with abciximab in percutaneous coronary intervention. *The American journal of cardiology* 2003; **91**(1): 1-5.
101. Mishkel GJ, Aguirre FV, Ligon RW, Rocha-Singh KJ, Lucore CL. Clopidogrel as adjunctive antiplatelet therapy during coronary stenting. *Journal of the American College of Cardiology* 1999; **34**(7): 1884-90.
102. Rupprecht HJ, Darius H, Borkowski U, et al. Comparison of antiplatelet effects of aspirin, ticlopidine, or their combination after stent implantation. *Circulation* 1998; **97**(11): 1046-52.
103. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; **101**(2): 207-13.
104. Yoshida O, Hirayama H, Nanasato M, Watanabe T, Murohara T. The angiotensin II receptor blocker candesartan cilexetil reduces neointima proliferation after coronary stent implantation: a prospective randomized study under intravascular ultrasound guidance. *American heart journal* 2005; **149**(1): e2.
105. Friedland SN, Eisenberg MJ, Shimony A. Meta-analysis of randomized controlled trials on effect of cilostazol on restenosis rates and outcomes after percutaneous coronary intervention. *The American journal of cardiology* 2012; **109**(10): 1397-404.
106. Kozuma K, Hara K, Yamasaki M, et al. Effects of cilostazol on late lumen loss and repeat revascularization after Palmaz-Schatz coronary stent implantation. *American heart journal* 2001; **141**(1): 124-30.
107. Ferrero V, Ribichini F, Pesarini G, Brunelleschi S, Vassanelli C. Glucocorticoids in the prevention of restenosis after coronary angioplasty: therapeutic potential. *Drugs* 2007; **67**(9): 1243-55.
108. Kuchulakanti P, Waksman R. Therapeutic potential of oral antiproliferative agents in the prevention of coronary restenosis. *Drugs* 2004; **64**(21): 2379-88.
109. Waksman R, Ajani AE, Pichard AD, et al. Oral rapamycin to inhibit restenosis after stenting of de novo coronary lesions: the Oral Rapamune to Inhibit Restenosis (ORBIT) study. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; **44**(7): 1386-92.
110. Tardif JC, Gregoire J, L'Allier PL. Prevention of restenosis with antioxidants: mechanisms and implications. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2002; **2**(5): 323-34.
111. Franks AM, Gardner SF. AGI-1067: a novel vascular protectant for prevention of restenosis. *The Annals of pharmacotherapy* 2006; **40**(1): 66-73.
112. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circulation research* 1999; **85**(3): 221-8.
113. Powell TM, Paul JD, Hill JM, et al. Granulocyte colony-stimulating factor mobilizes functional endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2005; **25**(2): 296-301.
114. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine* 1999; **5**(4): 434-8.

115. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; **275**(5302): 964-7.
116. Shi Q, Rafii S, Wu MH, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; **92**(2): 362-7.
117. Casella G, Werner F, Klauss V, Mudra H. Successful treatment of coronary artery perforation during angioplasty using a new membrane-coated stent. *The Journal of invasive cardiology* 1999; **11**(10): 622-6.
118. Gercken U, Lansky AJ, Buellesfeld L, et al. Results of the Jostent coronary stent graft implantation in various clinical settings: procedural and follow-up results. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2002; **56**(3): 353-60.
119. Takano M, Mizuno K. Coronary angioscopic evaluation for serial changes of luminal appearance after pharmacological and catheter interventions. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2010; **74**(2): 240-5.
120. Saxon RR, Chervu A, Jones PA, et al. Heparin-bonded, expanded polytetrafluoroethylene-lined stent graft in the treatment of femoropopliteal artery disease: 1-year results of the VIPER (Viabahn Endoprosthesis with Heparin Bioactive Surface in the Treatment of Superficial Femoral Artery Obstructive Disease) trial. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 2013; **24**(2): 165-73; quiz 74.
121. Hagenmuller F, Sander C, Sander R, Ries G, Classen M. Laser and endoluminal 192-iridium radiation. *Endoscopy* 1987; **19 Suppl 1**: 16-8.
122. Bottcher HD, Schopohl B, Liermann D, Kollath J, Adamietz IA. Endovascular irradiation--a new method to avoid recurrent stenosis after stent implantation in peripheral arteries: technique and preliminary results. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 1994; **29**(1): 183-6.
123. Condado JA, Waksman R, Gurdiel O, et al. Long-term angiographic and clinical outcome after percutaneous transluminal coronary angioplasty and intracoronary radiation therapy in humans. *Circulation* 1997; **96**(3): 727-32.
124. Waksman R, Robinson KA, Crocker IR, Gravanis MB, Cipolla GD, King SB, 3rd. Endovascular low-dose irradiation inhibits neointima formation after coronary artery balloon injury in swine. A possible role for radiation therapy in restenosis prevention. *Circulation* 1995; **91**(5): 1533-9.
125. Teirstein PS, Massullo V, Jani S, et al. Catheter-based radiotherapy to inhibit restenosis after coronary stenting. *The New England journal of medicine* 1997; **336**(24): 1697-703.
126. Giap H, Massullo V, Teirstein P, Tripuraneni P. Theoretical assessment of late cardiac complication from endovascular brachytherapy for restenosis prevention. *Cardiovascular radiation medicine* 1999; **1**(3): 233-8.
127. Waksman R, Raizner AE, Yeung AC, Lansky AJ, Vandertie L. Use of localised intracoronary beta radiation in treatment of in-stent restenosis: the INHIBIT randomised controlled trial. *Lancet* 2002; **359**(9306): 551-7.
128. Makkar R, Whiting J, Li A, et al. Effects of beta(-)-emitting (188)Re balloon in stented porcine coronary arteries: an angiographic, intravascular ultrasound, and histomorphometric study. *Circulation* 2000; **102**(25): 3117-23.
129. Haase J, von Neumann-Cosel P, Damm M, et al. Comparison of a centered 32P source wire system with a noncentered 90Sr/Y brachytherapy system for intracoronary beta-radiation following PCI of diffuse in-stent restenosis. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* 2005; **6**(4): 140-6.

130. Park S, Kang WC, Rhee JH, et al. Intracoronary ¹⁶⁶Holmium brachytherapy combined with cutting balloon angioplasty for the treatment of in-stent restenosis. *Cardiovascular radiation medicine* 2003; **4**(3): 119-25.
131. Suntharalingam M, Laskey W, Lansky AJ, et al. Clinical and angiographic outcomes after use of ⁹⁰Strontium/⁹⁰Yttrium beta radiation for the treatment of in-stent restenosis: results from the Stents and Radiation Therapy 40 (START 40) registry. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2002; **52**(4): 1075-82.
132. Balter S, Oetgen M, Hill A, et al. Personnel exposure during gamma endovascular brachytherapy. *Health physics* 2000; **79**(2): 136-46.
133. Albiero R, Colombo A. European high-activity (³²P) radioactive stent experience. *The Journal of invasive cardiology* 2000; **12**(8): 416-21.
134. Carter AJ, Jenkins S, Sweet W, et al. Dose and dose rate effects of beta-particle emitting radioactive stents in a porcine model of restenosis. *Cardiovascular radiation medicine* 1999; **1**(4): 327-35.
135. Albiero R, Nishida T, Adamian M, et al. Edge restenosis after implantation of high activity (³²P) radioactive beta-emitting stents. *Circulation* 2000; **101**(21): 2454-7.
136. Silber S. [Intracoronary radiation therapy in controlled and open clinical trials with afterloading systems and "hot" balloon catheters. Analysis of 6,692 patients]. *Herz* 2002; **27**(1): 30-55.
137. Mosseri M, Tamari I, Plich M, et al. Short- and long-term outcomes of the titanium-NO stent registry. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* 2005; **6**(1): 2-6.
138. Simon C, Palmaz JC, Sprague EA. Protein interactions with endovascular prosthetic surfaces. *Journal of long-term effects of medical implants* 2000; **10**(1-2): 127-41.
139. Whelan DM, van der Giessen WJ, Krabbendam SC, et al. Biocompatibility of phosphorylcholine coated stents in normal porcine coronary arteries. *Heart* 2000; **83**(3): 338-45.
140. Baur HR, Meier B. The Titan stent, just a good bare metal stent or more? *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2012; **8**(3): 295-7.
141. Serruys PW, Emanuelsson H, van der Giessen W, et al. Heparin-coated Palmaz-Schatz stents in human coronary arteries. Early outcome of the Benestent-II Pilot Study. *Circulation* 1996; **93**(3): 412-22.
142. Grube E, Buellesfeld L. BioMatrix Biolimus A9-eluting coronary stent: a next-generation drug-eluting stent for coronary artery disease. *Expert review of medical devices* 2006; **3**(6): 731-41.
143. Dake MD, Van Alstine WG, Zhou Q, Ragheb AO. Polymer-free paclitaxel-coated Zilver PTX Stents--evaluation of pharmacokinetics and comparative safety in porcine arteries. *Journal of vascular and interventional radiology : JVIR* 2011; **22**(5): 603-10.
144. Carrie D, Berland J, Verheye S, et al. A multicenter randomized trial comparing amphimus- with paclitaxel-eluting stents in de novo native coronary artery lesions. *Journal of the American College of Cardiology* 2012; **59**(15): 1371-6.
145. Carlyle WC, McClain JB, Tzafiri AR, et al. Enhanced drug delivery capabilities from stents coated with absorbable polymer and crystalline drug. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012; **162**(3): 561-7.
146. Serruys PW, Onuma Y, Dudek D, et al. Evaluation of the second generation of a bioresorbable everolimus-eluting vascular scaffold for the treatment of de novo coronary artery stenosis: 12-month clinical and imaging outcomes. *Journal of the American College of Cardiology* 2011; **58**(15): 1578-88.

147. van der Giessen WJ, Lincoff AM, Schwartz RS, et al. Marked inflammatory sequelae to implantation of biodegradable and nonbiodegradable polymers in porcine coronary arteries. *Circulation* 1996; **94**(7): 1690-7.
148. Coury AJ, Stokes KB, Cahalan PT, Slaikeu PC. Biostability considerations for implantable polyurethanes. *Life support systems : the journal of the European Society for Artificial Organs* 1987; **5**(1): 25-39.
149. Holmes DR, Camrud AR, Jorgenson MA, Edwards WD, Schwartz RS. Polymeric stenting in the porcine coronary artery model: differential outcome of exogenous fibrin sleeves versus polyurethane-coated stents. *Journal of the American College of Cardiology* 1994; **24**(2): 525-31.
150. Frisch EE. Silicones in artificial organs. In: Gebelein CG e, ed. *Polymeric Materials and Artificial Organs*. Washington, DC; 1984: 63-97.
151. Bakker D, van Blitterswijk CA, Hesselings SC, Koerten HK, Kuijpers W, Grote JJ. Biocompatibility of a polyether urethane, polypropylene oxide, and a polyether polyester copolymer. A qualitative and quantitative study of three alloplastic tympanic membrane materials in the rat middle ear. *Journal of biomedical materials research* 1990; **24**(4): 489-515.
152. Murphy JG, Schwartz RS, Huber KC, Holmes DR, Jr. Polymeric stents: modern alchemy or the future? *The Journal of invasive cardiology* 1991; **3**(3): 144-8.
153. Biggs KB, Balss KM, Maryanoff CA. Pore Networks and Polymer Rearrangement on a Drug-Eluting Stent as Revealed by Correlated Confocal Raman and Atomic Force Microscopy. *Langmuir* 2012; **28**(21): 8238-43.
154. Sirianni RW, Jang E-H, Miller KM, Saltzman WM. Parameter estimation methodology in a model of hydrophobic drug release from a polymer coating. *Journal of Controlled Release* 2010; **142**(3): 474-82.
155. Zhu J-Z, Xiong X-W, Du R, et al. Hemocompatibility of drug-eluting coronary stents coated with sulfonated poly (styrene-block-isobutylene-block-styrene). *Biomaterials* 2012; **33**(33): 8204-12.
156. Vergnol G, Renard E, Haroun F, et al. Electrografting of a biodegradable layer as a primer adhesion coating onto a metallic stent: in vitro and in vivo evaluations. *J Mater Sci: Mater Med* 2013: 1-11.
157. Lao LL, Venkatraman SS. Paclitaxel release from single and double-layered poly(DL-lactide-co-glycolide)/poly(L-lactide) film for biodegradable coronary stent application. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2008; **87A**(1): 1-7.
158. Jabara R, Chronos N, Conway D, Molema W, Robinson K. Evaluation of a novel slow-release paclitaxel-eluting stent with a bioabsorbable polymeric surface coating. *JACC Cardiovascular interventions* 2008; **1**(1): 81-7.
159. Ino JM, Sju E, Ollivier V, Yim EK, Letourneur D, Le Visage C. Evaluation of hemocompatibility and endothelialization of hybrid poly(vinyl alcohol) (PVA)/gelatin polymer films. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2013.
160. Westedt U, Wittmar M, Hellwig M, et al. Paclitaxel releasing films consisting of poly(vinyl alcohol)-graft-poly(lactide-co-glycolide) and their potential as biodegradable stent coatings. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2006; **111**(1-2): 235-46.
161. Koosha F, Muller RH, Davis SS. Polyhydroxybutyrate as a drug carrier. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems* 1989; **6**(2): 117-30.
162. Miller ND, Williams DF. On the biodegradation of poly-beta-hydroxybutyrate (PHB) homopolymer and poly-beta-hydroxybutyrate-hydroxyvalerate copolymers. *Biomaterials* 1987; **8**(2): 129-37.

163. Chin-Quee SL, Hsu SH, Nguyen-Ehrenreich KL, et al. Endothelial cell recovery, acute thrombogenicity, and monocyte adhesion and activation on fluorinated copolymer and phosphorylcholine polymer stent coatings. *Biomaterials* 2010; **31**(4): 648-57.
164. Rogers CD. Optimal stent design for drug delivery. *Reviews in cardiovascular medicine* 2004; **5 Suppl 2**: S9-S15.
165. Pitt CG. Poly- ϵ -caprolactone and its copolymers. In: Chasin M LR, eds, ed. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* :. New York, NY: Marcel Dekker Inc; 1990.
166. Woodward SC, Brewer PS, Moatamed F, Schindler A, Pitt CG. The intracellular degradation of poly(epsilon-caprolactone). *Journal of biomedical materials research* 1985; **19**(4): 437-44.
167. Agrawal CM, Haas KF, Leopold DA, Clark HG. Evaluation of poly(L-lactic acid) as a material for intravascular polymeric stents. *Biomaterials* 1992; **13**(3): 176-82.
168. Beck A. [A new balloon-expandable plastic endoprosthesis. Initial report of experience with the malleable thermostent]. *Der Radiologe* 1990; **30**(7): 347-50.
169. Ormiston JA, Serruys PW, Regar E, et al. A bioabsorbable everolimus-eluting coronary stent system for patients with single de-novo coronary artery lesions (ABSORB): a prospective open-label trial. *Lancet* 2008; **371**(9616): 899-907.
170. Zidar J, Lincoff AM, Stack R. Biodegradable stents. In: (ed) TE, editor. *Textbook of Interventional Cardiology*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 1994. p. 802.
171. Chiellini E, Corti A, D'Antone S, Solaro R. Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials. *Progress in Polymer Science* 2003; **28**(6): 963-1014.
172. Lam CX, Savalani MM, Teoh SH, Hutmacher DW. Dynamics of in vitro polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions. *Biomedical materials (Bristol, England)* 2008; **3**(3): 034108.
173. Hankermeyer CR, Tjeerdema RS. Polyhydroxybutyrate: plastic made and degraded by microorganisms. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 1999; **159**: 1-24.
174. de Waha A, Stefanini GG, King LA, et al. Long-term outcomes of biodegradable polymer versus durable polymer drug-eluting stents in patients with diabetes a pooled analysis of individual patient data from 3 randomized trials. *International journal of cardiology* 2013; **168**(6): 5162-6.
175. Verheye S, Agostoni P, Dawkins KD, et al. The GENESIS (Randomized, Multicenter Study of the Pimecrolimus-Eluting and Pimecrolimus/Paclitaxel-Eluting Coronary Stent System in Patients with De Novo Lesions of the Native Coronary Arteries) trial. *JACC Cardiovascular interventions* 2009; **2**(3): 205-14.
176. Windecker S, Serruys PW, Wandel S, et al. Biolimus-eluting stent with biodegradable polymer versus sirolimus-eluting stent with durable polymer for coronary revascularisation (LEADERS): a randomised non-inferiority trial. *Lancet* 2008; **372**(9644): 1163-73.
177. Giles K, Hibbert B, Drzymala L, et al. Three year clinical outcomes with zotarolimus (Endeavor) drug-eluting stents in an unrestricted contemporary practice. *International journal of cardiology* 2013; **168**(1): 595-6.
178. Salu KJ, Bosmans JM, Huang Y, et al. Effects of cytochalasin D-eluting stents on intimal hyperplasia in a porcine coronary artery model. *Cardiovascular research* 2006; **69**(2): 536-44.
179. Stone GW, Rizvi A, Newman W, et al. Everolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in coronary artery disease. *The New England journal of medicine* 2010; **362**(18): 1663-74.
180. Serruys PW, Kutryk MJ, Ong AT. Coronary-artery stents. *The New England journal of medicine* 2006; **354**(5): 483-95.

181. Zimarino M, De Caterina R. Actinomycin D-eluting stents do not reduce the risk of restenosis. Commentary. *Evidence-based cardiovascular medicine* 2005; **9**(1): 41-3.
182. Tamburino C, Di Salvo ME, Capodanno D, et al. Real world safety and efficacy of the Janus Tacrolimus-Eluting stent: long-term clinical outcome and angiographic findings from the Tacrolimus-Eluting STent (TEST) registry. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2009; **73**(2): 243-8.
183. Letourneur D, Caleb BL, Castellet JJ, Jr. Heparin binding, internalization, and metabolism in vascular smooth muscle cells: I. Upregulation of heparin binding correlates with antiproliferative activity. *Journal of cellular physiology* 1995; **165**(3): 676-86.
184. Wilson NV, Salisbury JR, Kakkar VV. Effect of low molecular weight heparin on intimal hyperplasia. *The British journal of surgery* 1991; **78**(11): 1381-3.
185. Deux JF, Meddahi-Pelle A, Bree F, Bataille I, Michel JB, Letourneur D. Comparative studies on the mechanisms of action of four polysaccharides on arterial restenosis. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 2009; **20**(5-6): 689-702.
186. Hlawaty H, Suffee N, Sutton A, et al. Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. *Biochemical Pharmacology* 2011; **81**(2): 233-43.
187. Segev A, Nili N, Osherov AB, et al. A perlecan-inducing compound significantly inhibits smooth muscle cell function and in-stent intimal hyperplasia: novel insights into the diverse biological effects of perlecan. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2010; **6**(1): 134-40.
188. Freguin-Bouilland C, Alkhatib B, David N, et al. Low molecular weight fucoidan prevents neointimal hyperplasia after aortic allografting. *Transplantation* 2007; **83**(9): 1234-41.
189. Joner M, Cheng Q, Schonhofer-Merl S, et al. Polymer-free immobilization of a cyclic RGD peptide on a nitinol stent promotes integrin-dependent endothelial coverage of strut surfaces. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2012; **100**(3): 637-45.
190. Zago AC, Matte BS, Reginato L, et al. First-in-man study of simvastatin-eluting stent in de novo coronary lesions: the SIMVASTENT study. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2012; **76**(5): 1109-14.
191. Katsiki N, Tziomalos K, Chatzizisis Y, Elisaf M, Hatzitolios AI. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? *Atherosclerosis* 2010; **211**(1): 9-14.
192. Balk EM, Karas RH, Jordan HS, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of statins on vascular structure and function: a systematic review. *The American journal of medicine* 2004; **117**(10): 775-90.
193. Duggan ST. Pitavastatin: a review of its use in the management of hypercholesterolaemia or mixed dyslipidaemia. *Drugs* 2012; **72**(4): 565-84.
194. Indolfi C, Curcio A, Chiariello M. Simvastatin reduces neointimal thickening after experimental angioplasty. *Circulation* 2003; **107**(3): e25.
195. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2005; **45**: 89-118.
196. Palmerini T, Biondi-Zoccai G, Della Riva D, et al. Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *Lancet* 2012; **379**(9824): 1393-402.

197. Hill R, Bagust A, Bakhai A, et al. Coronary artery stents: a rapid systematic review and economic evaluation. *Health technology assessment (Winchester, England)* 2004; **8**(35): iii-iv, 1-242.
198. Daemen J, Wenaweser P, Tsuchida K, et al. Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study. *Lancet* 2007; **369**(9562): 667-78.
199. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzi E, et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2005; **293**(17): 2126-30.
200. Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, Ho KK, D'Agostino R, Cutlip DE. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. *The New England journal of medicine* 2007; **356**(10): 1020-9.
201. Pocock SJ. Safety of drug-eluting stents: demystifying network meta-analysis. *Lancet* 2007; **370**(9605): 2099-100.
202. Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation* 2003; **108**(14): 1701-6.
203. Finn AV, Kolodgie FD, Harnek J, et al. Differential response of delayed healing and persistent inflammation at sites of overlapping sirolimus- or paclitaxel-eluting stents. *Circulation* 2005; **112**(2): 270-8.
204. Joner M, Finn AV, Farb A, et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; **48**(1): 193-202.
205. Kolandaivelu K, Swaminathan R, Gibson WJ, et al. Stent thrombogenicity early in high-risk interventional settings is driven by stent design and deployment and protected by polymer-drug coatings. *Circulation* 2011; **123**(13): 1400-9.
206. Lincoff AM, Popma JJ, Ellis SG, Hacker JA, Topol EJ. Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: clinical, angiographic and therapeutic profile. *Journal of the American College of Cardiology* 1992; **19**(5): 926-35.
207. Virmani R, Guagliumi G, Farb A, et al. Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* 2004; **109**(6): 701-5.
208. Kaufmann BA, Kaiser C, Pfisterer ME, Bonetti PO. Coronary stent infection: a rare but severe complication of percutaneous coronary intervention. *Swiss medical weekly* 2005; **135**(33-34): 483-7.
209. Blanchemain N, Karrouf Y, Tabary N, et al. Comparative study of vascular prostheses coated with polycyclodextrins for controlled ciprofloxacin release. *Carbohydr Polym* 2012; **90**(4): 1695-703.
210. Taha M, Chai F, Blanchemain N, Goube M, Martel B, Hildebrand HF. Validating the poly-cyclodextrins based local drug delivery system on plasma-sprayed hydroxyapatite coated orthopedic implant with toluidine blue O. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications* 2013; **33**(5): 2639-47.
211. Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, et al. Nanoscale oxidative patterning of metallic surfaces to modulate cell activity and fate. *Nano letters* 2009; **9**(2): 659-65.
212. Shi Z, Neoh KG, Kang ET. In vitro endothelialization of cobalt chromium alloys with micro/nanostructures using adipose-derived stem cells. *Journal of materials science Materials in medicine* 2013; **24**(4): 1067-77.
213. Lv W, Liu L, Luo Y, Wang X, Liu Y. Biotinylated thermoresponsive core cross-linked nanoparticles via RAFT polymerization and "click" chemistry. *Journal of Colloid and Interface Science* 2011; **356**(1): 16-23.

214. Blanchemain N, Karrouf Y, Tabary N, et al. Methyl-beta-cyclodextrin modified vascular prosthesis: Influence of the modification level on the drug delivery properties in different media. *Acta biomaterialia* 2011; **7**(1): 304-14.
215. Uchida E, Uyama Y, Ikada Y. Sorption of low-molecular-weight anions into thin polycation layers grafted onto a film. *Langmuir* 1993; **9**(4): 1121-4.
216. Hamerli P, Weigel T, Groth T, Paul D. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethyleneterephthalat membranes. *Biomaterials* 2003; **24**(22): 3989-99.
217. Sano S, Kato K, Ikada Y. Introduction of functional groups onto the surface of polyethylene for protein immobilization. *Biomaterials* 1993; **14**(11): 817-22.
218. Ilanchelian M, Retna Raj C, Ramaraj R. Spectral Studies on the Cyclodextrin Inclusion Complexes of Toluidine Blue O and Meldola's Blue in Aqueous Solution. *Journal of Inclusion Phenomena* 2000; **36**(1): 9-20.
219. Danel C, Azaroual N, Chavaria C, Odou P, Martel B, Vaccher C. Comparative study of the complex forming ability and enantioselectivity of cyclodextrin polymers by CE and 1H NMR. *Carbohydrate Polymers* 2013; **92**(2): 2282-92.
220. Hornez JC, Lefevre A, Joly D, Hildebrand HF. Multiple parameter cytotoxicity index on dental alloys and pure metals. *Biomolecular engineering* 2002; **19**(2-6): 103-17.
221. Frazier ME. In vitro clonal growth assay for evaluating toxicity of metal salt. In: Kharasch N, ed. Trace metals in health and disease. Raven Press ed. New York: Andrews, T.K.; 1979: 71-81.
222. Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, Unger RE, Peters K, Lehr HA, Kirkpatrick CJ. Generation of human pulmonary microvascular endothelial cell lines. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2001; **81**(12): 1717-27.
223. Chai F, Ochsenbein A, Traisnel M, Busch R, Breme J, Hildebrand HF. Improving endothelial cell adhesion and proliferation on titanium by sol-gel derived oxide coating. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2010; **92A**(2): 754-65.
224. Hamid R, Rotshteyn Y, Rabadi L, Parikh R, Bullock P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 2004; **18**(5): 703-10.
225. 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* 2000; **267**(17): 5421-6.
226. Maurel B. RESTENOSE INTRA-STENT : EVALUATION DE NOUVELLES THERAPEUTIQUES IN VIVO ET ELABORATION D'UN MODELE EX VIVO HEMODYNAMIQUE. LILLE: Université Lille 2; 2012.
227. Lowe HC, James B, Khachigian LM. A novel model of in-stent restenosis: rat aortic stenting. *Heart* 2005; **91**(3): 393-5.
228. Mewissen MW. Primary nitinol stenting for femoropopliteal disease. *Journal of endovascular therapy : an official journal of the International Society of Endovascular Specialists* 2009; **16**(2 Suppl 2): II63-81.
229. Couchet G, Maurel B, Sobocinski J, et al. An optimal combination for EVAR: low profile endograft body and continuous spiral stent limbs. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2013; **46**(1): 29-33.
230. Torsello G, Troisi N, Donas KP, Austermann M. Evaluation of the Endurant stent graft under instructions for use vs off-label conditions for endovascular aortic aneurysm repair. *Journal of vascular surgery* 2011; **54**(2): 300-6.
231. Chen H-T, Chung C-J, Yang T-C, et al. Osteoblast growth behavior on micro-arc oxidized [beta]-titanium alloy. *Surf Coat Technol* 2010; **205**(5): 1624-9.

232. Li P, Ohtsuki C, Kokubo T, Nakanishi K, Soga N, de Groot K. The role of hydrated silica, titania, and alumina in inducing apatite on implants. *Journal of Biomedical Materials Research* 1994; **28**(1): 7-15.
233. He F, Zhang F, Yang G, Wang X, Zhao S. Enhanced initial proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells on HF/HNO₃ solution treated nanostructural titanium surface. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2010; **110**(4): e13-e22.
234. Nanci A, Wuest JD, Peru L, et al. Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules. *Journal of Biomedical Materials Research* 1998; **40**(2): 324-35.
235. ASTM standard B600, Annual Book of ASTM Standard. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials; 1997.
236. Eliaz N, Ritman-Hertz O, Aronov D, et al. The effect of surface treatments on the adhesion of electrochemically deposited hydroxyapatite coating to titanium and on its interaction with cells and bacteria. *J Mater Sci: Mater Med* 2011; **22**(7): 1741-52.
237. Roux C, Chai F, Ollivier N, et al. Ti-Cp functionalization by deposition of organic/inorganic silica nanoparticles. *Biomol Eng* 2007; **24**(5): 549-54.
238. Wen HB, Wolke JGC, de Wijn JR, Liu Q, Cui FZ, de Groot K. Fast precipitation of calcium phosphate layers on titanium induced by simple chemical treatments. *Biomaterials* 1997; **18**(22): 1471-8.
239. Kim H-M, Miyaji F, Kokubo T, Nakamura T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment. *Journal of biomedical materials research* 1996; **32**(3): 409-17.
240. Wang X-X, Hayakawa S, Tsuru K, Osaka A. Bioactive titania gel layers formed by chemical treatment of Ti substrate with a H₂O₂/HCl solution. *Biomaterials* 2002; **23**(5): 1353-7.
241. Variola F, Yi J-H, Richert L, Wuest JD, Rosei F, Nanci A. Tailoring the surface properties of Ti6Al4V by controlled chemical oxidation. *Biomaterials* 2008; **29**(10): 1285-98.
242. Macyk W, Szacilowski K, Stochel G, Buchalska M, Kuncewicz J, Labuz P. Titanium(IV) complexes as direct TiO₂ photosensitizers. *Coordination Chemistry Reviews* 2010; **254**(21-22): 2687-701.
243. Heiney PA, Grüneberg K, Fang J, Dulcey C, Shashidhar R. Structure and Growth of Chromophore-Functionalized (3-Aminopropyl)triethoxysilane Self-Assembled on Silicon. *Langmuir* 2000; **16**(6): 2651-7.
244. Siqueira Petri DF, Wenz G, Schunk P, Schimmel T. An Improved Method for the Assembly of Amino-Terminated Monolayers on SiO₂ and the Vapor Deposition of Gold Layers. *Langmuir* 1999; **15**(13): 4520-3.
245. El-Ghannam AR, Ducheyne P, Risbud M, et al. Model surfaces engineered with nanoscale roughness and RGD tripeptides promote osteoblast activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2004; **68A**(4): 615-27.
246. Balasundaram G, Sato M, Webster TJ. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD. *Biomaterials* 2006; **27**(14): 2798-805.
247. Yoshioka T, Tsuru K, Hayakawa S, Osaka A. Preparation of alginic acid layers on stainless-steel substrates for biomedical applications. *Biomaterials* 2003; **24**(17): 2889-94.
248. Puleo DA. Activity of enzyme immobilized on silanized Co-Cr-Mo. *Journal of biomedical materials research* 1995; **29**(8): 951-7.
249. Schwartz J, Avaltroni MJ, Danahy MP, et al. Cell attachment and spreading on metal implant materials. *Materials Science and Engineering: C* 2003; **23**(3): 395-400.

250. Sargeant TD, Rao MS, Koh C-Y, Stupp SI. Covalent functionalization of NiTi surfaces with bioactive peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 2008; **29**(8): 1085-98.
251. Dubruel P, Vanderleyden E, Bergada M, et al. Comparative study of silanisation reactions for the biofunctionalisation of Ti-surfaces. *Surface Science* 2006; **600**(12): 2562-71.
252. Olmos D, González-Benito J, Aznar AJ, Baselga J. Hydrolytic damage study of the silane coupling region in coated silica microfibres: pH and coating type effects. *Journal of Materials Processing Technology* 2003; **143-144**: 82-6.
253. Howarter JA, Youngblood JP. Surface Modification of Polymers with 3-Aminopropyltriethoxysilane as a General Pretreatment for Controlled Wettability. *Macromolecules* 2007; **40**(4): 1128-32.
254. Watson H, Norström A, Torrkulla Å, Rosenholm J. Aqueous Amino Silane Modification of E-glass Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 2001; **238**(1): 136-46.
255. White LD, Tripp CP. Reaction of (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane with Amine Catalysts on Silica Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 2000; **232**(2): 400-7.
256. Etienne M, Walcarius A. Analytical investigation of the chemical reactivity and stability of aminopropyl-grafted silica in aqueous medium. *Talanta* 2003; **59**(6): 1173-88.
257. Weiping Q, Bin X, Lei W, et al. Controlled Site-Directed Assembly of Antibodies by Their Oligosaccharide Moieties onto APTES Derivatized Surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science* 1999; **214**(1): 16-9.
258. Puleo DA. Retention of enzymatic activity immobilized on silanized Co-Cr-Mo and Ti-6Al-4V. *Journal of biomedical materials research* 1997; **37**(2): 222-8.
259. McGill PR, Idriss H. DFT study of carboxylic acids modes of adsorption on rutile TiO₂(0 1 1) surfaces. *Surface Science* 2008; **602**(24): 3688-95.
260. Ojamäe L, Aulin C, Pedersen H, Käll P-O. IR and quantum-chemical studies of carboxylic acid and glycine adsorption on rutile TiO₂ nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science* 2006; **296**(1): 71-8.
261. Nilsing M, Lunell S, Persson P, Ojamäe L. Phosphonic acid adsorption at the TiO₂ anatase (1 0 1) surface investigated by periodic hybrid HF-DFT computations. *Surface Science* 2005; **582**(1-3): 49-60.
262. Pellerite MJ, Dunbar TD, Boardman LD, Wood EJ. Effects of Fluorination on Self-Assembled Monolayer Formation from Alkanephosphonic Acids on Aluminum: Kinetics and Structure. *The Journal of Physical Chemistry B* 2003; **107**(42): 11726-36.
263. Yee C, Kataby G, Ulman A, et al. Self-Assembled Monolayers of Alkanesulfonic and -phosphonic Acids on Amorphous Iron Oxide Nanoparticles. *Langmuir* 1999; **15**(21): 7111-5.
264. Ardalán P, Brennan TP, Lee H-B-R, et al. Effects of Self-Assembled Monolayers on Solid-State CdS Quantum Dot Sensitized Solar Cells. *ACS Nano* 2011; **5**(2): 1495-504.
265. Gawalt ES, Lu G, Bernasek SL, Schwartz J. Enhanced Bonding of Alkanephosphonic Acids to Oxidized Titanium Using Surface-Bound Alkoxyzirconium Complex Interfaces. *Langmuir* 1999; **15**(26): 8929-33.
266. Raman A, Dubey M, Gouzman I, Gawalt ES. Formation of Self-Assembled Monolayers of Alkylphosphonic Acid on the Native Oxide Surface of SS316L. *Langmuir* 2006; **22**(15): 6469-72.
267. Kanta A, Sedev R, Ralston J. The formation and stability of self-assembled monolayers of octadecylphosphonic acid on titania. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 2006; **291**(1-3): 51-8.
268. Mani G, Johnson DM, Marton D, et al. Drug delivery from gold and titanium surfaces using self-assembled monolayers. *Biomaterials* 2008; **29**(34): 4561-73.

269. Adden N, Gamble LJ, Castner DG, Hoffmann A, Gross G, Menzel H. Phosphonic Acid Monolayers for Binding of Bioactive Molecules to Titanium Surfaces. *Langmuir* 2006; **22**(19): 8197-204.
270. Arita T, Moriya K-i, Yoshimura T, Minami K, Naka T, Adschiri T. Dispersion of Phosphonic Acids Surface-Modified Titania Nanocrystals in Various Organic Solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2010; **49**(20): 9815-21.
271. Quiñones R, Gawalt ES. Study of the Formation of Self-Assembled Monolayers on Nitinol. *Langmuir* 2007; **23**(20): 10123-30.
272. Putvinski TM, Schilling ML, Katz HE, Chidsey CED, Mujsce AM, Emerson AB. Self-assembly of organic multilayers with polar order using zirconium phosphate bonding between layers. *Langmuir* 1990; **6**(10): 1567-71.
273. Gademann K, Kobylinska J, Wach J-Y, Woods T. Surface modifications based on the cyanobacterial siderophore anachelin: from structure to functional biomaterials design. *BioMetals* 2009; **22**(4): 595-604.
274. Walsby A. The extracellular products of *Anabaena cylindrica* Lemm. I. Isolation of a macromolecular pigment-peptide complex. *British Phycological Journal* 1974; (9): 371-81.
275. Faure E, Lecomte P, Lenoir S, et al. Sustainable and bio-inspired chemistry for robust antibacterial activity of stainless steel. *Journal of Materials Chemistry* 2011; **21**(22): 7901-4.
276. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* 2007; **318**(5849): 426-30.
277. Waite JH, Tanzer ML. Polyphenolic Substance of *Mytilus edulis*: Novel Adhesive Containing L-Dopa and Hydroxyproline. *Science* 1981; **212**(4498): 1038-40.
278. Lee H, Scherer NF, Messersmith PB. Single-molecule mechanics of mussel adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; **103**(35): 12999-3003.
279. Oesterhelt F, et al. Single molecule force spectroscopy by AFM indicates helical structure of poly(ethylene-glycol) in water. *New Journal of Physics* 1999; **1**(1): 6.
280. Marie H, Barrere A, Schoenstein F, Chavanne MH, Grosogeat B, Mora L. PEM anchorage on titanium using catechol grafting. *PloS one* 2012; **7**(11): e50326.
281. Martin ST, Kesselman JM, Park DS, Lewis NS, Hoffmann MR. Surface Structures of 4-Chlorocatechol Adsorbed on Titanium Dioxide. *Environmental Science & Technology* 1996; **30**(8): 2535-42.
282. Izaoumen N, Cubillana-Aguilera LM, Naranjo-Rodríguez I, et al. β -Sonogel-Carbon electrodes: A new alternative for the electrochemical determination of catecholamines. *Talanta* 2009; **78**(2): 370-6.
283. Lunsford SK, Choi H, Stinson J, Yearly A, Dionysiou DD. Voltammetric determination of catechol using a sonogel carbon electrode modified with nanostructured titanium dioxide. *Talanta* 2007; **73**(1): 172-7.
284. Brittain WJ, Minko S. A structural definition of polymer brushes. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2007; **45**(16): 3505-12.
285. Barbey R, Lavanant L, Paripovic D, et al. Polymer Brushes via Surface-Initiated Controlled Radical Polymerization: Synthesis, Characterization, Properties, and Applications. *Chemical reviews* 2009; **109**(11): 5437-527.
286. Caster KC. Applications of Polymer Brushes and Other Surface-Attached Polymers. *Polymer Brushes: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*; 2005: 329-70.
287. Bünsow J, Kelby TS, Huck WTS. Polymer Brushes: Routes toward Mechanosensitive Surfaces. *Accounts of Chemical Research* 2009; **43**(3): 466-74.
288. Li L, Hu W, Chi L, Fuchs H. Polymer Brush and Inorganic Oxide Hybrid Nanodielectrics for High Performance Organic Transistors. *Journal of Physical Chemistry B* 2010; **114**(16): 5315-9.

289. Liu X, Ye Q, Yu B, Liang Y, Liu W, Zhou F. Switching Water Droplet Adhesion Using Responsive Polymer Brushes. *Langmuir* 2010; **26**(14): 12377-82.
290. Ma H, Li D, Sheng X, Zhao B, Chilkoti A. Protein-Resistant Polymer Coatings on Silicon Oxide by Surface-Initiated Atom Transfer Radical Polymerization. *Langmuir* 2006; **22**(8): 3751-6.
291. Minko S. Grafting on Solid Surfaces: “Grafting to” and “Grafting from” Methods Polymer Surfaces and Interfaces. In: Stamm M, ed.: Springer Berlin Heidelberg; 2008: 215-34.
292. Ye P, Dong H, Zhong M, Matyjaszewski K. Synthesis of Binary Polymer Brushes via Two-Step Reverse Atom Transfer Radical Polymerization. *Macromolecules* 2011; **44**(7): 2253-60.
293. Draper J, Luzinov I, Minko S, Tokarev I, Stamm M. Mixed Polymer Brushes by Sequential Polymer Addition: Anchoring Layer Effect. *Langmuir* 2004; **20**(10): 4064-75.
294. Szwarc M. ‘Living’ Polymers. *Nature* 1956; **178**(4543): 1168-9.
295. Higashimura T, Kishiro O. Possible Formation of Living Polymers of p-Methoxystyrene by Iodine. *Polymer Journal* 1977; **9**(1): 87-93.
296. Takeuchi D, Inoue A, Ishimaru F, Osakada K. Living Ring-Opening Polymerization of 2-Alkoxy-1-methylenecyclopropanes Initiated by Pd Complexes. *Macromolecules* 2008; **41**(17): 6339-46.
297. Hilf S, Kilbinger AFM. Functional end groups for polymers prepared using ring-opening metathesis polymerization. *Nat Chem* 2009; **1**(7): 537-46.
298. Matyjaszewski K, Wang J-L, Grimaud T, Shipp DA. Controlled/“Living” Atom Transfer Radical Polymerization of Methyl Methacrylate Using Various Initiation Systems. *Macromolecules* 1998; **31**(5): 1527-34.
299. Moad G, Rizzardo E, Thang SH. Living radical polymerization by the RAFT process. *Australian Journal of Chemistry* 2005; **58**(6): 379-410.
300. Perrier S, Takolpuckdee P. Macromolecular design via reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT)/xanthates (MADIX) polymerization. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry* 2005; **43**(22): 5347-93.
301. Pintauer T, Matyjaszewski K. Structural aspects of copper catalyzed atom transfer radical polymerization. *Coordination Chemistry Reviews* 2005; **249**(11-12): 1155-84.
302. Iovu MC, Matyjaszewski K. Controlled/Living Radical Polymerization of Vinyl Acetate by Degenerative Transfer with Alkyl Iodides. *Macromolecules* 2003; **36**(25): 9346-54.
303. Favier A, D'Agosto F, Charreyre MT, Pichot C. Synthesis of N-acryloxysuccinimide copolymers by RAFT polymerization, as reactive building blocks with full control of composition and molecular weights. *Polymer* 2004; **45**(23): 7821-30.
304. Relógio P, Charreyre M-T, Farinha JPS, Martinho JMG, Pichot C. Well-defined polymer precursors synthesized by RAFT polymerization of N,N-dimethylacrylamide/N-acryloxysuccinimide: random and block copolymers. *Polymer* 2004; **45**(26): 8639-49.
305. Qin Z, Liu W, Li L, Guo L, Yao C, Li X. Galactosylated N-2-Hydroxypropyl Methacrylamide-b-N-3-Guanidinopropyl Methacrylamide Block Copolymers as Hepatocyte-Targeting Gene Carriers. *Bioconjugate chemistry* 2011; **22**(8): 1503-12.
306. Zhang C, Zhou Y, Liu Q, Li S, Perrier Sb, Zhao Y. Facile Synthesis of Hyperbranched and Star-Shaped Polymers by RAFT Polymerization Based on a Polymerizable Trithiocarbonate. *Macromolecules* 2011; **44**(7): 2034-49.
307. Pissuwan D, Boyer C, Gunasekaran K, Davis TP, Bulmus V. In vitro cytotoxicity of RAFT polymers. *Biomacromolecules* 2010; **11**(2): 412-20.
308. Chong YK, Krstina J, Le TPT, et al. Thiocarbonylthio Compounds [SC(Ph)S-R] in Free Radical Polymerization with Reversible Addition-Fragmentation Chain Transfer (RAFT

- Polymerization). Role of the Free-Radical Leaving Group (R). *Macromolecules* 2003; **36**(7): 2256-72.
309. Zobrist Cd, Sobocinski J, Lyskawa JI, et al. Functionalization of Titanium Surfaces with Polymer Brushes Prepared from a Biomimetic RAFT Agent. *Macromolecules* 2011; **44**(15): 5883-92.
310. Hu Z, Liu Y, Hong C, Pan C. Synthesis of well-defined glycoconjugate polyacrylamides via preactivated polymers prepared by ATRP. *Journal of Applied Polymer Science* 2005; **98**(1): 189-94.
311. Kjellén L, Lindahl U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem* 1991; **60**.
312. Marshall S, Bacote V, Traxinger RR. Complete inhibition of glucose-induced desensitization of the glucose transport system by inhibitors of mRNA synthesis. Evidence for rapid turnover of glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. *The Journal of biological chemistry* 1991; **266**(16): 10155-61.
313. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney international Supplement* 2000; **77**: S13-8.
314. Duan W, Paka L, Pillarisetti S. Distinct effects of glucose and glucosamine on vascular endothelial and smooth muscle cells: evidence for a protective role for glucosamine in atherosclerosis. *Cardiovascular diabetology* 2005; **4**: 16.
315. Stott W. Ethanolamine. . Encyclopedia of toxicology: Elsevier Inc.; 2005 p. 266-9.
316. Mendis E, Kim M-M, Rajapakse N, Kim S-K. Suppression of cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages by novel cationic glucosamine derivative involves down-regulation of NF- κ B and MAPK expressions. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; **16**(18): 8390-6.
317. ISO/EN-10993-5. Biological evaluation of medical devices—Part 5 tests for cytotoxicity, in vitro methods: 8.2 tests on extracts.
318. Ochsenbein A, Chai F, Winter S, Traisnel M, Breme J, Hildebrand HF. Osteoblast responses to different oxide coatings produced by the sol-gel process on titanium substrates. *Acta biomaterialia* 2008; **4**(5): 1506-17.
319. Chesler M, Chan CY. Stimulus-induced extracellular pH transients in the in vitro turtle cerebellum. *Neuroscience* 1988; **27**(3): 941-8.
320. Takahashi KI, Copenhagen DR. Modulation of neuronal function by intracellular pH. *Neuroscience research* 1996; **24**(2): 109-16.
321. Ma J, Lu M, Cao C, Zhang H. Preparation and Characterization of PMMA/MMT Organic-Inorganic Hybrid Materials via RAFT Polymerization. *Journal of Macromolecular Science, Part A* 2013; **50**(6): 653-60.
322. Che X-C, Jin Y-Z, Lee Y-S. Preparation of nano-TiO₂/polyurethane emulsions via in situ RAFT polymerization. *Progress in Organic Coatings* 2010; **69**(4): 534-8.
323. Hojjati B, Charpentier PA. Synthesis of TiO₂-polymer nanocomposite in supercritical CO₂ via RAFT polymerization. *Polymer* 2010; **51**(23): 5345-51.
324. Hojjati B, Sui R, Charpentier PA. Synthesis of TiO₂/PAA nanocomposite by RAFT polymerization. *Polymer* 2007; **48**(20): 5850-8.
325. Lowes B, Bohrer A, Tran T, Shipp D. Grafting of polystyrene “from” and “through” surface modified titania nanoparticles. *Polymer Bulletin* 2009; **62**(3): 281-9.
326. Meuer S, Fischer K, Mey I, Janshoff A, Schmidt M, Zentel R. Liquid Crystals from Polymer-Functionalized TiO₂ Nanorod Mesogens. *Macromolecules* 2008; **41**(21): 7946-52.
327. Meuer S, Oberle P, Theato P, Tremel W, Zentel R. Liquid Crystalline Phases from Polymer-Functionalized TiO₂ Nanorods. *Adv Mater* 2007; **19**(16): 2073-8.

328. Little PJ, Drennon KD, Tannock LR. Glucosamine inhibits the synthesis of glycosaminoglycan chains on vascular smooth muscle cell proteoglycans by depletion of ATP. *Archives of physiology and biochemistry* 2008; **114**(2): 120-6.
329. Yu M, Deming TJ. Synthetic Polypeptide Mimics of Marine Adhesives. *Macromolecules* 1998; **31**(15): 4739-45.
330. Hwang DS, Gim Y, Yoo HJ, Cha HJ. Practical recombinant hybrid mussel bioadhesive fp-151. *Biomaterials* 2007; **28**(24): 3560-8.
331. Ayyadurai N, Deepankumar K, Prabhu NS, Lee S, Yun H. A facile and efficient method for the incorporation of multiple unnatural amino acids into a single protein. *Chemical communications (Cambridge, England)* 2011; **47**(12): 3430-2.
332. Choi BH, Choi YS, Kang DG, Kim BJ, Song YH, Cha HJ. Cell behavior on extracellular matrix mimic materials based on mussel adhesive protein fused with functional peptides. *Biomaterials* 2010; **31**(34): 8980-8.
333. Dalsin JL, Hu BH, Lee BP, Messersmith PB. Mussel adhesive protein mimetic polymers for the preparation of nonfouling surfaces. *J Am Chem Soc* 2003; **125**(14): 4253-8.
334. Murphy JL, Vollenweider L, Xu F, Lee BP. Adhesive Performance of Biomimetic Adhesive-Coated Biologic Scaffolds. *Biomacromolecules* 2010.
335. Statz AR, Meagher RJ, Barron AE, Messersmith PB. New peptidomimetic polymers for antifouling surfaces. *J Am Chem Soc* 2005; **127**(22): 7972-3.
336. Xu C, Xu K, Gu H, et al. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles. *J Am Chem Soc* 2004; **126**(32): 9938-9.
337. He T, Shi ZL, Fang N, Neoh KG, Kang ET, Chan V. The effect of adhesive ligands on bacterial and fibroblast adhesions to surfaces. *Biomaterials* 2009; **30**(3): 317-26.
338. Lee H, Rho J, Messersmith PB. Facile Conjugation of Biomolecules onto Surfaces via Mussel Adhesive Protein Inspired Coatings. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla)* 2009; **21**(4): 431-4.
339. Poh CK, Shi Z, Lim TY, Neoh KG, Wang W. The effect of VEGF functionalization of titanium on endothelial cells in vitro. *Biomaterials* 2010; **31**(7): 1578-85.
340. Yang SH, Kang SM, Lee KB, Chung TD, Lee H, Choi IS. Mussel-inspired encapsulation and functionalization of individual yeast cells. *J Am Chem Soc* 2011; **133**(9): 2795-7.
341. Wei Q, Li B, Yi N, et al. Improving the blood compatibility of material surfaces via biomolecule-immobilized mussel-inspired coatings. *Journal of biomedical materials research Part A* 2011; **96**(1): 38-45.
342. Bae IH, Park IK, Park DS, Lee H, Jeong MH. Thromboresistant and endothelialization effects of dopamine-mediated heparin coating on a stent material surface. *Journal of materials science Materials in medicine* 2012; **23**(5): 1259-69.
343. Luo R, Tang L, Zhong S, et al. In vitro investigation of enhanced hemocompatibility and endothelial cell proliferation associated with quinone-rich polydopamine coating. *ACS applied materials & interfaces* 2013; **5**(5): 1704-14.
344. Yang Z, Tu Q, Zhu Y, et al. Mussel-inspired coating of polydopamine directs endothelial and smooth muscle cell fate for re-endothelialization of vascular devices. *Advanced healthcare materials* 2012; **1**(5): 548-59.
345. Jiang J, Zhu L, Zhu L, Zhu B, Xu Y. Surface Characteristics of a Self-Polymerized Dopamine Coating Deposited on Hydrophobic Polymer Films. *Langmuir* 2011; **27**(23): 14180-7.
346. Ju KY, Lee Y, Lee S, Park SB, Lee JK. Bioinspired polymerization of dopamine to generate melanin-like nanoparticles having an excellent free-radical-scavenging property. *Biomacromolecules* 2011; **12**(3): 625-32.

347. Bernsmann F, Ball V, Addiego F, et al. Dopamine-Melanin Film Deposition Depends on the Used Oxidant and Buffer Solution. *Langmuir* 2011.
348. French D. The Schardinger dextrans. *Advances in carbohydrate chemistry* 1957; **12**: 189-260.
349. Szejtli J. Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chemical reviews* 1998; **98**(5): 1743-54.
350. Li Z, Wang M, Wang F, et al. gamma-Cyclodextrin: a review on enzymatic production and applications. *Applied microbiology and biotechnology* 2007; **77**(2): 245-55.
351. Gould S, Scott RC. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review *Food Chem Toxicol* 2005; **43**(10).
352. Uekama K, Irie T. Industrial uses of methylated cyclodextrins derivatives. . In: Duchene D, ed. *Cyclodextrins and Their Industrial Uses*. Paris: Editions de santé; 1987.
353. Dubes A, Degobert G, Fessi H, Parrot-Lopez H. Synthesis and characterisation of sulfated amphiphilic alpha-, beta- and gamma-cyclodextrins: application to the complexation of acyclovir. *Carbohydrate research* 2003; **338**(21): 2185-93.
354. Laza-Knoerr AL, Gref R, Couvreur P. Cyclodextrins for drug delivery. *Journal of drug targeting* 2010; **18**(9): 645-56.
355. Loftsson T, Brewster ME. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of pharmaceutical sciences* 1996; **85**(10): 1017-25.
356. Ritter, Helmut, Tabatabai, Monir G. Cyclodextrin in polymer synthesis: a green way to polymers. . UK; 2002.
357. van de Manakker F, Vermonden T, van Nostrum CF, Hennink WE. Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications. *Biomacromolecules* 2009; **10**(12): 3157-75.
358. Hishiya T, Asanuma H, Komiyama M. Spectroscopic anatomy of molecular-imprinting of cyclodextrin. Evidence for preferential formation of ordered cyclodextrin assemblies. *J Am Chem Soc* 2002; **124**(4): 570-5.
359. Thatiparti TR, Shoffstall AJ, von Recum HA. Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics. *Biomaterials* 2010; **31**(8): 2335-47.
360. Martel B, Blanchemain N, Boschin F, et al., inventors; Biomatériaux porteurs de Cyclodextrines aux propriétés d'absorption améliorées et de libération progressive et retardée de molécules thérapeutiques. 2006.
361. Boschin F, Blanchemain N, Bria M, et al. Improved drug delivery properties of PVDF membranes functionalized with beta-cyclodextrin--application to guided tissue regeneration in periodontology. *Journal of biomedical materials research Part A* 2006; **79**(1): 78-85.
362. Tabary N, Chai F, Blanchemain N, et al. A chlorhexidine-loaded biodegradable cellulosic device for periodontal pockets treatment. *Acta biomaterialia* 2013.
363. Lepretre S, Chai F, Hornez JC, et al. Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers. *Biomaterials* 2009; **30**(30): 6086-93.
364. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Martel B, Neut C, Hildebrand HF, Haulon S. Safety, healing, and efficacy of vascular prostheses coated with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin polymer: experimental in vitro and animal studies. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2012; **43**(2): 188-97.
365. Ducoroy L, Martel B, Bacquet B, Morcellet M. Ion exchange textiles from the finishing of PET fabrics with cyclodextrins and citric acid for the sorption of metallic cations in water. *Journal of Inclusion Phenomena* 2007; **57**(1-4): 271-7.

366. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 1: Surface modification with cyclodextrins of PET prostheses. *Biomolecular engineering* 2007; **24**(1): 149-53.
367. Blanchemain N, Haulon S, Boschini F, et al. Vascular prostheses with controlled release of antibiotics Part 2. In vitro biological evaluation of vascular prostheses treated by cyclodextrins. *Biomolecular engineering* 2007; **24**(1): 143-8.
368. Blanchemain N, Chai F, Haulon S, et al. Biological behaviour of an endothelial cell line (HPMEC) on vascular prostheses grafted with hydroxypropylgamma-cyclodextrine (HPgamma-CD) and hydroxypropylbeta-cyclodextrine (HPbeta-CD). *Journal of materials science Materials in medicine* 2008; **19**(6): 2515-23.
369. Blanchemain N, Laurent T, Haulon S, et al. In vitro study of a HP γ -cyclodextrin grafted PET vascular prosthesis for application as anti-infectious drug delivery system. *Journal of Inclusion Phenomena* 2007; **57**(1-4): 675-81.
370. Jean-Baptiste E, Blanchemain N, Neut C, et al. Evaluation of the anti-infectious properties of polyester vascular prostheses functionalised with cyclodextrin. *The Journal of infection* 2013.
371. Tabary N, Lepretre S, Boschini F, et al. Functionalization of PVDF membranes with carbohydrate derivatives for the controlled delivery of chlorhexidin. *Biomolecular engineering* 2007; **24**(5): 472-6.
372. Laurent T, Kacem I, Blanchemain N, et al. Cyclodextrin and maltodextrin finishing of a polypropylene abdominal wall implant for the prolonged delivery of ciprofloxacin. *Acta biomaterialia* 2011; **7**(8): 3141-9.
373. Chai F, Abdelkarim M, Laurent T, et al. Anti-cancer bone reconstruction with polycyclodextrin functionalized porous bioceramics for local chemotherapy. *Journal of biomedical materials research Part A* 2013; (*In Press*).
374. Cotton C. The Superlastic and Shape Memory Properties of Nitinol. *Materials Science & Technology* 2010; **53**(4): 266.
375. Kang J, Sakuragi M, Shibata A, et al. Immobilization of epidermal growth factor on titanium and stainless steel surfaces via dopamine treatment. *Materials Science and Engineering: C* 2012; **32**(8): 2552-61.
376. Lee H, Lee BP, Messersmith PB. A reversible wet/dry adhesive inspired by mussels and geckos. *Nature* 2007; **448**(7151): 338-41.
377. Luo X, Zhao X, Xu S, Wang B. The exo-substituted [eta]4-cyclopentadiene CpCo(I) complexes: A new kind of ATRP catalysts and the actual catalyst for the cobaltocene-catalyzed ATRP. *Polymer* 2009; **50**(3): 796-801.
378. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *Journal of Applied Polymer Science* 2005; **97**(2): 433-42.
379. Blanchemain N, Haulon S, Martel B, Traisnel M, Morcellet M, Hildebrand HF. Vascular PET prostheses surface modification with cyclodextrin coating: development of a new drug delivery system. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2005; **29**(6): 628-32.
380. Blanchemain N, Laurent T, Chai F, et al. Polyester vascular prostheses coated with a cyclodextrin polymer and activated with antibiotics: cytotoxicity and microbiological evaluation. *Acta biomaterialia* 2008; **4**(6): 1725-33.
381. Graham DG, Tiffany SM, Bell WR, Jr., Gutknecht WF. Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Molecular pharmacology* 1978; **14**(4): 644-53.

382. Alcaro S, Ventura CA, Paolino D, et al. Preparation, characterization, molecular modeling and in vitro activity of paclitaxel-cyclodextrin complexes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 2002; **12**(12): 1637-41.
383. Dordunoo SK, Burt HM. Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins. *Int J Pharm* 1996; **133**: 191-201.
384. Bouquet W, Ceelen W, Fritzing B, et al. Paclitaxel/beta-cyclodextrin complexes for hyperthermic peritoneal perfusion - formulation and stability. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics : official journal of Arbeitsgemeinschaft fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik eV* 2007; **66**(3): 391-7.
385. Fresta M, Guccione S, Beccari AR, Furneri PM, Puglisi G. Combining molecular modeling with experimental methodologies: mechanism of membrane permeation and accumulation of ofloxacin. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2002; **10**(12): 3871-89.
386. Hamada H, Ishihara K, Masuoka N, Mikuni K, Nakajima N. Enhancement of water-solubility and bioactivity of paclitaxel using modified cyclodextrins. *Journal of bioscience and bioengineering* 2006; **102**(4): 369-71.
387. Croons V, De Meyer I, Houten SM, et al. Effect of statins on the viability of macrophages and smooth muscle cells. *Journal of cardiovascular pharmacology* 2010; **55**(3): 269-75.
388. Hechler B, Freund M, Alame G, 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**(2): 412-20.
389. Hyvelin JM, Maurel B, 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**(2): 417-28.
390. Jia H, Liu H, Kong J, et al. A novel polymer-free paclitaxel-eluting stent with a nanoporous surface for rapid endothelialization and inhibition of intimal hyperplasia: Comparison with a polymer-based sirolimus-eluting stent and bare metal stent in a porcine model. *Journal of biomedical materials research Part A* 2011; **98**(4): 629-37.
391. Klugherz BD, Llanos G, Lieuallen W, et al. Twenty-eight-day efficacy and pharmacokinetics of the sirolimus-eluting stent. *Coronary artery disease* 2002; **13**(3): 183-8.
392. Casani L, Juan O, Serra A, et al. A new DES with anti-inflammatory and antiproliferative activity reduces in-stent restenosis. *Eur Heart J* 2009; **30** (**Abstract Supplement**): 532.
393. Wang J-L, Ren K-F, Chang H, et al. Direct Adhesion of Endothelial Cells to Bioinspired Poly(dopamine) Coating Through Endogenous Fibronectin and Integrin $\alpha 5\beta 1$. *Macromolecular Bioscience* 2013; **13**(4): 483-93.
394. Maurel B, Sarraf C, Lermusiaux P, Bakir F, inventors; BANC DE TEST POUR STENT. France. 2012.
395. Guerin P, Rondeau F, Grimandi G, et al. Neointimal hyperplasia after stenting in a human mammary artery organ culture. *Journal of vascular research* 2004; **41**(1): 46-53.
396. Davis E, Bolin V. Continuous cultivation of isogenous cell lines from the human embryo. *Federation proceedings* 1960; **19**.
397. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *The Journal of cell biology* 1983; **96**(1): 191-8.
398. Linez-Bataillon P, Monchau F, Bigerelle M, Hildebrand HF. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates. *Biomolecular engineering* 2002; **19**(2-6): 133-41.

399. 10993-1 I. Évaluation biologique des dispositifs médicaux -- Partie 1: Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque. 2009.

7. Table des illustrations

<i>Figure 1 - Schéma de la constitution d'une paroi artérielle et de ses tuniques (d'après G Lefthériotis, CHU Angers, France).....</i>	18
<i>Figure 2 - (a) Schéma de l'athérogenèse (d'après H.C. STARY, 1994²) en 11 étapes depuis la constitution d'un amas lipidique à la surface de la paroi artérielle jusqu'à la rupture de la plaque athéroscléreuse ; (b) Signalisation de l'athérogenèse ³</i>	18
<i>Figure 3 - Schéma de coupes transversales d'une artère inter-ventriculaire antérieure présentant des lésions intimaux initiales de la maladie athéroscléreuse jusqu'au stade le plus évolué de la maladie ²</i>	19
<i>Figure 4 - Vue macroscopique en coupe transversale d'une artère coronaire présentant une sténose athéromateuse sévère (source inconnue)</i>	20
<i>Figure 5 - Vue peropératoire d'une TEA du bulbe carotidien. On voit parfaitement le plan de clivage emportant la plaque d'athérome développée aux dépens de l'intima</i>	21
<i>Figure 6 - Effet de la dilatation au ballon plein selon Dotter ²²</i>	22
<i>Figure 7 - effet de la dilatation à l'aide d'une sonde à ballonnet utilisé par Gruntzig sur la paroi artérielle selon Castaneda-Zuniga ; (a) : plaque athéroscléreuse sténosante, (b) : le ballon dégonflé est positionné en regard de la zone à traiter, (c) : écrasement-refoulement-étirement de la plaque d'athérome et de la paroi artérielle, (d) : l'effet appliqué est maintenu après retrait du ballon.....</i>	23
<i>Figure 8 - Schématisation des maillages des différents stents auto-expansibles sur le marché (d'après AbbottVascular R&D department)</i>	26
<i>Figure 9 - Resténose intra-stent ; hyperplasie néointimale associée à un remodelage constrictif vont occlure progressivement la lumière artérielle (d'après Serruys PW).....</i>	30
<i>Figure 10 - Modèles existants de stents « actifs » à libération de médicaments (d'après Grube E, 2006 ¹⁴²)</i>	33
<i>Figure 11 - Mécanismes cellulaires impliqués dans la resténose. On voit le site d'action du Sirolimus d'une part (inhibiteur mTOR, bloquant le cycle cellulaire en phase G1) et du Paclitaxel d'autre part (dégradation du réseau de tubuline bloquant la mitose en prophase ¹⁸⁰</i>	37
<i>Figure 12 - Structure de la Rosuvastatine, caractérisée par la présence d'un groupement fluoré</i>	38
<i>Figure 13 - Formule de la dopamine (a) et du tris (b)</i>	41
<i>Figure 14 - Formule de l'acide citrique (CTR) utilisé</i>	42

Figure 15 - Formule du catalyseur (NaH_2PO_2) utilisé.....	42
Figure 16 - Formule du PTX et de la simvastatine	42
Figure 17 - Formule de la glucosamine.....	43
Figure 18 - photo de la polisseuse automatique PHOENIX 4000, (Buehler, Germany) permettant de polir 6 pastilles à la fois ; le temps, la pression et la vitesse de rotation sont déterminés par l'opérateur.....	44
Figure 19 - Formule du Bleu de Toluidine Ortho	49
Figure 20 - Illustration du principe de complexation du TBO par le polymère de CD puis le dosage (HAc : acide acétique) ou la cinétique de libération (PBS) du TBO.	50
Figure 21 - Préparation des stents (1 : CoCr nu, 2 : CoCr oxydé, 3 : CoCr fonctionnalisé par PDA, 4 :CoCr fonctionnalisé par PDA-PM β CD) sur les supports permettant leur analyse en MEB - photo prise avant l'étape de pulvérisation du film de carbone (métallisation)	53
Figure 22 - Boîtes de clones après 9 jours d'incubation en présence des poudres testées et coloration (gauche) et vue microscopique d'un clone (droite).....	54
Figure 23 - Calcul de l'index d'hémolyse (OD=densité optique).....	56
Figure 24 - Stent CoCr coronaire MultilinkVision, AbbottVascular	56
Figure 25 - Principe général schématique (a) et structurel (b)) de la fonctionnalisation du titane par greffage en surface de polymères complexés fonctionnalisés par des molécules thérapeutiques.....	58
Figure 26 - Les trois types de chélation possibles sur un substrat à base de titane. R, représente la molécule se greffant et D, les ligands permettant l'accroche.....	61
Figure 27 - exemple de silane possédant un groupement partant	62
Figure 28 - Structure d'un acide phosphonique couramment employé pour la modification de surface de titane : le 3-aminopropylphosphonique.....	63
Figure 29 - La protéine mefp5 (B), responsable des propriétés adhésives des byssus des moules marinières (A) ont une concentration élevée en fonctions catéchols (C, D). Représentation de la dopamine (E) (d'après H.Lee, Science 2007 ²⁷⁶).....	64
Figure 30 – Evaluation par AFM de la force nécessaire pour arracher un motif catéchol greffé sur une surface de titane (d'après Oesterhelt, 1999 ²⁷⁹)	64
Figure 31 - Représentation des différents modes d'adhésion des catéchols sur le titane : chélation bidentate (a), chélation monodentate avec liaison hydrogène (b), pont bidentate (c).	65
Figure 32 - Voltampérogramme d'un échantillon de titane modifié par la dopamine. Conditions : Tampon phosphate pH=7, v=50mV/s vs Ag/AgCl	65

Figure 33 - Elaboration de polymères brosses au moyen de la stratégie « graft to » par greffage direct (a) ou en deux étapes par la stratégie du « graft from » (b).....	66
Figure 34 - Mécanisme de polymérisation radicalaire contrôlée de type RAFT	69
Figure 35 - Agent de transfert de type trithiocarbonate	70
Figure 36 - Synthèse de la dopamine-RAFT	71
Figure 37 - Spectre RMN-1H de l'ancre dopamine-RAFT.....	72
Figure 38 - schéma de synthèse du monomère NAS	73
Figure 39 - Paramètres utilisés pour la polymérisation RAFT du monomère NAS en présence des agents de transfert RAFT; $[M]_0$, $[RAFT]_0$, $[A]_0$: concentration initiale respectivement du monomère, de l'agent de transfert et de l'amorceur. Le rapport Monomère/Solvant est exprimé en pourcentage	73
Figure 40 - Cinétique de polymérisation RAFT du NAS à partir des 2 agents de transfert RAFT (dopamine-RAFT et benzyl-RAFT). (a) Evolution de la conversion en fonction du temps. (b) Evolution de la masse molaire M_n et de l'indice de polymolécularité en fonction du taux de conversion.....	74
Figure 41 - Spectres RMN- ¹ H des polymères dopamine-pNAS (a) et benzyl-pNAS (b) (Solvant DMSO)	75
Figure 42 - Structure chimique de la Glucosamine.....	76
Figure 43 - Effets de la glucosamine et du glucose sur les cellules musculaires lisses endothéliales (a et b) et les cellules endothéliales (c) (d'après Duan W ³¹⁴).....	76
Figure 44 - Principe de la post-fonctionnalisation des polymères PNAS par la glucosamine et l'éthanolamine.....	77
Figure 45 - Spectres RMN ¹ H de chlorhydrate de glucosamine (vert), et des polymères de dopamine-pNGlu 100u-40% (bleu).....	78
Figure 46 - Spectroscopie UV du dopamine-pNGlu 100u – 40% (bleu), et de l'agent de transfert dopamine-RAFT (vert) $C = 1.10^{-4}$ mol.l-1.....	79
Figure 47 - Polymères de Dopamine-pNAS-100 unités fonctionnalisés par 10, 20 et 40% de glucosamine.....	80
Figure 48 - Vues microscopiques (x20) de la surface des échantillons de titane oxydés par la solution de « piranha » en fonction de la durée d'immersion.	80
Figure 49 - Principe de la fonctionnalisation chimique du titane par des ancrs à base de dopamine	81

Figure 50 - Voltampérogramme d'un échantillon de titane modifié par la dopamine (polymère de NAS à 100 unités intégrant l'ancrage dopamine) (en bleu). Tampon phosphate pH=7, v=50mV/s vs Ag/AgCl.....	82
Figure 51 – Tests de vitalité (en haut) et de prolifération (en bas) cellulaires réalisés sur cellules MC3T3 après 3 et 6 jours de de contact avec les pastilles de titane oxydées (n=6)...	85
Figure 52 - (a) Structure des différentes molécules synthétisées et testés par études de viabilité cellulaire : a) dopamine-RAFT, b) dopamine (ammonium) (c) dopamine alcyne et (d) pyrrole alcyne.....	86
Figure 53 - Viabilité des cellules épithéliales L132 évaluées en présence de concentrations croissantes de poudre à base de dopamine (dopamine, dopamine-RAFT et dopamine-alcyne) et de pyrrole-alcyne ; TL :triple liaison.....	86
Figure 54 - Viabilité des cellules épithéliales L132 en présence de concentrations croissantes de polymère de glucosamine (n=2)	87
Figure 55 - Influence de la dopamine sur la cytotoxicité du polymère de glucosamine (n=2)	88
Figure 56 - Influence de la glucosamine dans la cytotoxicité du polymère de glucosamine- (dopamine -pNAS-Glu ou Dopa-NGlu) (n=2)	89
Figure 57 - Vitalité des cellules HUVEC après 3 et 6 jours sur les pastilles de titane fonctionnalisées	90
Figure 58 - Vitalité des cellules MC3T3-E1 après 3 et 6 jours sur les pastilles de titane fonctionnalisées	90
Figure 59- Schéma général de la fonctionnalisation du support métallique par une première couche adhésive de polydopamine et d'une seconde à base de polymère de cyclodextrine aux propriétés complexantes	93
Figure 60- A pH basique, la dopamine polymérise pour former la polydopamine.....	94
Figure 61 - Formule chimique semi-développée des cyclodextrines α , β et γ ³⁵⁰	95
Figure 62- Schéma de la formation d'un complexe d'inclusion à partir des cyclodextrines ...	96
Figure 63 – Mécanisme de formation du polymère de cyclodextrine (PCD) à partir du mélange CTR/NaH ₂ PO ₂ /βCD avec un ratio 10/3/10.....	98
Figure 64 - Stents en NiTinol non fonctionnalisé (a), fonctionnalisés par la polydopamine (b) puis enfin par le PDA-PCD (c). Au retrait du stent de son batch de cyclodextrine, la structure se brise comme une feuille	100
Figure 65 - Influence du temps d'imprégnation (1h et 16h) du CoCr dans la solution de dopamine sur la quantité de fonctions amines présente sur le CoCr-PDA par la méthode de l'acide orange II	102

Figure 66 - Influence du temps d'imprégnation (1h et 16h) du CoCr dans la solution de PDA sur la quantité de TBO adsorbée par le CoCr-PDA-PCD (après fonctionnalisation par le PCD)	102
Figure 67 – Influence du traitement thermique du CoCr fonctionnalisé par la PDA (CoCr PDA est le groupe contrôle sans recuit) sur le dosage des fonctions amines par la méthode de l'acide orange II	103
Figure 68 - Images de pastilles de CoCr-PDA-PCD après 6 jours dans le PBS. Sur la gauche de l'image, le revêtement de PCD a subi un traitement thermique (150°C-1h) alors que sur la droite de l'image le revêtement n'a pas subi de traitement thermique.....	104
Figure 69 - Influence de la PDA et de la température de recuit de la PDA sur la quantité de TBO adsorbée par les échantillons de CoCr fonctionnalisés	104
Figure 70 - Influence de la PDA et de la température de recuit sur la cinétique de libération du TBO adsorbée sur les échantillons de CoCr fonctionnalisés	105
Figure 71 - Influence de la température de polycondensation de la P β CD (a) et PMe β CD (b) sur la quantité de TBO adsorbée (temps de fixation 30 minutes)	107
Figure 72 - Influence de la température de polycondensation de la P β CD (a) et PMe β CD (b) sur la cinétique de libération du TBO dans le PBS (temps de fixation 30 minutes).....	108
Figure 73 – Influence du temps de la polycondensation à 150°C de PMe β CD des pastilles de CoCr sur les 6 premières heures de libération (gauche) de TBO dans PBS ; Influence du temps de la polycondensation sur la quantification finale (droite) de TBO.....	109
Figure 74 - Influence du temps de la polycondensation à 140°C de P β CD des pastilles de CoCr sur les 6 premières heures de libération (gauche) de TBO dans PBS ; Influence du temps de la polycondensation sur la quantification finale (droite) de TBO.....	109
Figure 75 - Cinétique de libération (a) et quantité (b) de TBO adsorbé sur des pastilles de CoCr fonctionnalisées par le P β CD ou par le PMe β CD.	110
Figure 76 - Quantité de TBO adsorbée sur les échantillons de CoCr-PDA-PCD neutralisées par le carbonate de sodium ou lavées par extraction au Soxhlet.....	111
Figure 77 - Images MEB du CoCr-PDA(a) et du CoCr-PDA-PCD (b) avec une rainure réalisée avec une pointe téflonnée pour estimer l'épaisseur de ce revêtement	112
Figure 78 - photos MEB du stent CoCr après fonctionnalisation par PDA (a) et PDA-PMe β CD (b).....	113
Figure 79 - Etude de la dégradation du PCD greffé sur un échantillon de CoCr-PDA dans le milieu de culture et dans le PBS en comparaison avec la cinétique de libération du TBO dans le PBS.....	114

Figure 80 - Viabilité des cellules L132 en contact pendant 9 jours avec les poudres de PDA, PMe β CD et de PDA-PMe β CD.....	115
Figure 81 - Prolifération des cellules HPMEC au contact des échantillons de CoCr ; CoCr-PDA et CoCr-PDA-PCD après 3 et 6 jours d'incubation.	116
Figure 82 - Vitalité des cellules HPMEC au contact des échantillons de CoCr ; CoCr-PDA et CoCr-PDA-PCD après 3 et 6 jours d'incubation.	117
Figure 83 - Diagramme de solubilité du PTX en présence de Me β CD et de PMe β CD.....	118
Figure 84 - Evaluation de la quantité restante de Paclitaxel sur le CoCr et sur le CoCr fonctionnalisé par PDA-PMe β CD (\varnothing 14.5 mm) après différents temps de libération dans le plasma humain à 37°C sous agitation douce (80rpm).....	119
Figure 85 - Vitalité des cellules endothéliales et musculaires lisses en fonction de concentrations croissantes de simvastatine	121
Figure 86 – Etude de l'interaction simvastatine/Me β CD par spectrophotométrie UV-Vis et détermination de la constante de complexation par la méthode de Benesi-Hildebrand.....	121
Figure 87 - Evolution de la solubilité de la simvastatine dans l'eau lors de l'augmentation de la concentration de Me β CD et du PMe β CD.....	122
Figure 88 - étude la cinétique de libération dans le plasma de la simvastatine depuis des pastilles de CoCr fonctionnalisées par PDA-P Me β CD.....	123
Figure 89 - Analyse histo-morphométrique à 28 jours d'une aorte de rat traitée par un stent nu (gauche de l'image) et par un stent actif coronaire actuellement sur le marché (droite de l'image) ; le ratio de l'épaisseur de la néointima et de la média est évaluée à 1,18 pour le stent nu et 0,52 pour le stent actif	124
Figure 90 – Ratio néointima/média des différents groupes de rat traités par stents CoCr nus, stents CoCr actif sur le marché, CoCr PDA-PMe β CD PTX et Simvastatine. Coupe transversale et vue macroscopique pour analyse histo-morphométrique d'aorte de rat explantée au 28 ^{ème} jour suivant le traitement par un stent CoCr fonctionnalisé par PDA-PMe β CD et imprégné de PTX (sur la gauche de l'image) ou imprégné de simvastatine (sur la droite de l'image)	124
Figure 91 - modèle de bioréacteur développé en partenariat avec l'ENSAM-Paris au cours des travaux de thèse de B Maurel. Le bioréacteur est constitué d'une pompe centrifuge (A), d'un réservoir (B), d'artère (silicone ou de aorte de rat prélevée) (C), d'un débitmètre (D) et d'un capteur de pressions (E)	129
Figure 92 - Cinétique de libération en % et valeur absolue du TBO dans PBS à partir du système multicouche (0,5 ; 5 ; 10 et 15 bicouches)	130

Figure 93 –Quantité de simvastatine et paclitaxel chargée dans le système multicouche	130
Figure 94- Boîte de clones et vue microscopique d'un clone après 9 jours d'incubation et coloration sur une poudre non toxique	164
Figure 95- (a) boîte NUNC 96 puits à fond noir, (b) Fluorimètre Twinkle LB 970 (Berthold)	166
Figure 96 - Boîte de prolifération COSTAR®	167
Figure 97 - Compteur de Cellules (ZI Coulter)	167
Figure 98 - Spectres RMN-1H du chlorhydrate de glucosamine et des polymères comportant différentes quantités de glucosamine	172
Figure 99 - Résultats des analyses GPC obtenus à partir du polymère soluble en fin de polymérisation déterminés par GPC DMF (équivalent PMMA)	173
Figure 100 - Schéma et photo d'une cellule d'électrochimie	174
Figure 101- Evolution de la tension appliquée en fonction du temps lors d'un cycle de voltampérométrie.....	175

8. Annexes

Annexe 1 : évaluations biologiques

Entretien des cellules

Les cellules sont cryo-conservées dans l'azote liquide à -180°C dans de petits tubes contenant 1,5 à 3.10⁶ cellules / mL de milieu de congélation spécifique. La mise en culture se fait par une décongélation rapide, la suspension cellulaire est ensuite mélangée à 10 mL de milieu de culture, les cellules sont centrifugées à 650 tours/min pendant 12 minutes et remises en suspension dans 150 mL de milieu de culture dans un flacon de 25 cm² (NUNC).

Le repiquage est réalisé tous les trois ou quatre jours avant que les cellules n'arrivent à confluence pour éviter tout risque d'altération du phénotype. Les cellules sont détachées par un mélange de trypsine (0,025% en volume) - EDTA (0,01% en volume GIBCO) pendant 7 minutes, puis remises en culture à la concentration de 150.000 cellules/mL.

Après décongélation, deux passages sont nécessaires pour que les cellules reprennent une activité normale. Le suivi de la culture est réalisé à l'aide du microscope optique (NIKON TMS). La lignée est repiquée un maximum de 25 fois (moins dans le cas des HUVEC). Les différents tests biologiques sont réalisés suivant la norme ISO 10993-/EN 30993-5³⁹.

Toutes les cultures sont entretenues dans une étuve BINDER à 37°C avec 5% CO₂ et 100% d'humidité relative.

Cellules L132

Les cellules L132 sont une lignée de cellules embryonnaires humaines. Cette lignée a été créée par E.V. Davis et V.S. Bolin en 1959³⁹⁶. Elles sont de type épithélial. Ces cellules seront utilisées dans les différents tests biologiques, elles ont les caractéristiques de lignées cellulaires immortalisées et elles ont la particularité de former des colonies ou clones avec un coefficient de clonage optimal de 37 à 40%. Ces cellules poussent dans différents milieux de culture (Morgan, Morton et Parker) 90%, 10% de sérum de veau fœtal, et des antibiotiques. Le renouvellement du milieu se fait 2 fois par semaine

Cellules MC3T3-E1³⁹⁷

Les cellules MC3T3-E1 (pour Mouse Calvarian) sont des cellules ostéoblastiques immortalisées. Elles sont commercialisées par ATCG. Elles sont mises en culture dans un milieu dépourvu d'acide ascorbique de type Eagle (MEM) enrichi de 10% de sérum de veau fœtal et d'antibiotiques. Le renouvellement du milieu se fait tous les 2 à 3 jours

Cellules HUVEC

Les cellules HUVEC (pour Human Umbilical Vein Endothelial Cell) sont des cellules primaires endothéliales de sang veineux ombilical. Elles sont isolées de la veine du cordon ombilical et sont utilisées dans des tests de cytocompatibilité.

Les HUVEC utilisées dans cette étude sont distribuées par Promocell. Elles sont prélevées sur un ou plusieurs donneurs. Les cultures sont faites dans un milieu spécifique (ECGM pour Endothelial Cell Growth Medium) 90%, 10% de sérum de veau fœtal, et des antibiotiques. Le renouvellement du milieu se fait 2 fois par semaine.

Cellules HPMEC

Les cellules HPMEC (pour Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cell) sont des cellules immortalisées isolées à partir de prélèvements d'adulte pour lesquelles 2 phénotypes ont été isolés : HPMEC-ST1 and HPMEC-ST2. Elles représentent un modèle valable pour l'étude de la physiopathologie endothéliale²²².

Viabilité cellulaire par la méthode du clonage

Le test de viabilité consiste à établir l'effet relatif de clonage (ERC) et par conséquent, la concentration létale 50% (LC50) en utilisant la méthode de formation de colonies avec des cellules épithéliales humaines en culture : lignée L132 (ATCC-CCL5) avec un coefficient de clonage élevé (37-40%). Ce test mesure quantitativement un seul critère de toxicité qui est la mort cellulaire ou survie cellulaire et est par conséquent spécifique, fiable et facilement reproductible. Il permet d'établir un rang de cytotoxicité pour toute substance chimique par la comparaison de leur LC50.

Les cellules sont préalablementensemencées dans des boîtes de culture 48 heures avant le test afin que les cellules se trouvent dans une phase exponentielle de prolifération pour la

manipulation. Elles sont ensuiteensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre 50 mm, Costar) à la densité initiale de 200 à 300 cellules/boîte pour obtenir environ 200 colonies par boîte de culture. Le milieu de culture est le MEM de Eagle (Eurobio), supplémenté par 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Eurobio). Le milieu contient de la vancomycine et de la fungizone. Les cellules sont exposées en continu dans 5 mL de milieu à des concentrations croissantes de poudre : 0 ; 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; et 400 $\mu\text{g/mL}$.

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO_2 pendant 9 jours.

En fin d'exposition, les boîtes sont colorées avec le cristal violet (*Figure 94*). Après séchage, les clones sont comptés en aveugle tout en écartant les clones contenant moins de 25-30 cellules. L'effet relatif de clonage (ERC) est calculé et exprimé en % par rapport à la culture contrôle (concentration = 0 $\mu\text{g/mL}$).

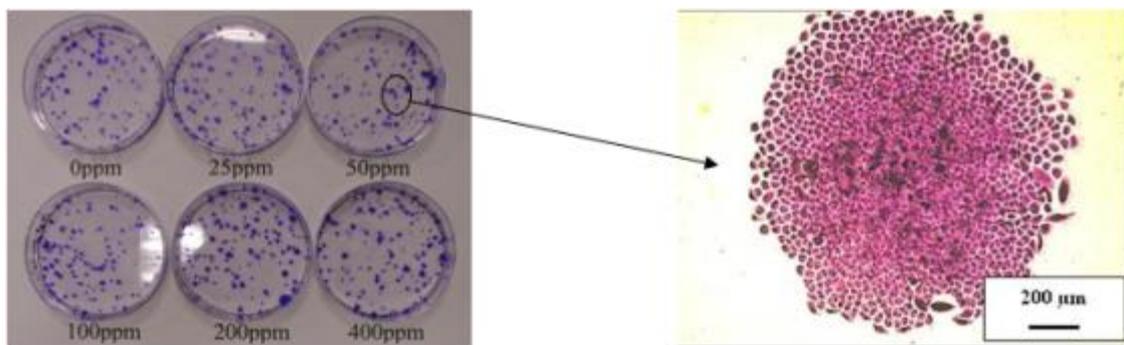


Figure 94- Boîte de clones et vue microscopique d'un clone après 9 jours d'incubation et coloration sur une poudre non toxique

Vitalité cellulaire

Ce test de fonction cellulaire consiste à quantifier la vitalité des cellules présentes sur le support à caractériser par dosage fluorométrique. Le réactif Bleu Alamar (Interchim) incorpore un indicateur de croissance colorimétrique et fluorescent basé sur la détection de l'activité métabolique cellulaire. Le système comprend un indicateur de l'oxydation / réduction qui devient fluorescent et change de couleur en réponse à la réduction chimique du milieu de culture. Cette transformation n'est possible que par des cellules vivantes. L'intensité de la coloration est proportionnelle à l'activité cellulaire.

L'indicateur du taux d'oxydo-réduction relatif au métabolisme cellulaire indique des changements clairs et stables. De plus, ce test a la particularité de ne pas être destructif puisque le réactif ne présente aucune toxicité, ce qui permet entre autre de poursuivre la culture après l'expérience. La vitalité relative est exprimée en pourcentage \pm écart type de la culture témoin. 2 échantillons pour chaque période d'exposition seront testés. Pour connaître le nombre de cellules à ensemercer dans chaque puits, un étalonnage préalable est réalisé. Cela montre que pour rester en phase de croissance exponentielle, nous déposerons pour ce test 7×10^3 cellules par puits pour les essais avec les cellules MC3T3-E1 et HPMEC et 10×10^3 cellules par puits avec les HUVEC.

Ce résultat est similaire à celui trouvé pour la prolifération cellulaire. Ainsi ce test pourra être réalisé en simultané avec le test de la prolifération.

Les pastilles de Titane testées ont été préalablement rincées à l'eau distillée dans un bain à ultrasons 2 fois 3 minutes puis immergées au moins 5 minutes dans l'éthanol sous la hotte avant d'être séchées durant au moins 1 heure sous la hotte.

Les cellules sont ensemençées dans des plaques multipuits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar) contenant les pastilles.

Préparation du Bleu Alamar

Prélever 1,2 mL de solution mère de Bleu Alamar (Interchim Réf. : UP669413)

Compléter pour obtenir 30 mL avec du tampon phosphate

Filtrer avec un filtre 0,22 μ m

Répartir environ 3 mL par tube

Conserver au congélateur

Les cellules sont mises à incuber à 37°C en atmosphère humide contenant 5% (v/v) de CO₂ pendant 3 et 6 jours. A la fin des périodes d'incubation des cellules (3 et 6 jours), le milieu est prélevé, et 500 μ L d'une solution à 10% en volume de Bleu Alamar sont ajoutés. La boîte est placée dans l'étuve à 37°C pendant 3 heures. A la fin de cette période, 150 μ L de chaque puits sont prélevés et placés dans une boîte NUNC 96 puits à fond noir (boîte NUNC 96 puits à fond noir, Figure 95a) en prenant soin de préserver de la lumière. La fluorescence est mesurée à 560 nm (Twinkle LB 970 – Berthold, Figure 95b).

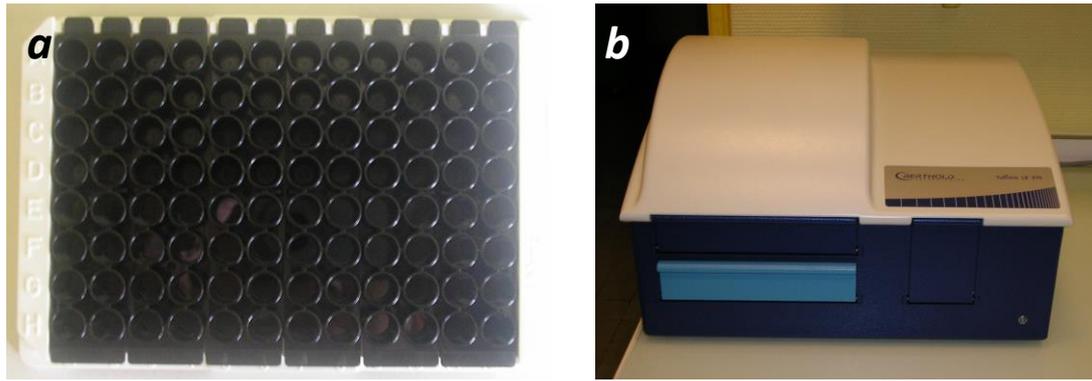


Figure 95- (a) boîte NUNC 96 puits à fond noir, (b) Fluorimètre Twinkle LB 970 (Berthold)

Prolifération cellulaire

Le test de prolifération cellulaire consiste en la détermination de la croissance cellulaire *in vitro* sur un support dont on veut évaluer la biocompatibilité. Le test est effectué sur des lignées cellulaires animales ou humaines provenant de préférence du site d'implantation (concept de cellules cibles) : ostéoblastes, fibroblastes, macrophages, cellules épithéliales, endothéliales, etc. Les cellules sont cultivées dans des plaques à 24 puits sur les pastilles d'une épaisseur de 3 mm et d'un diamètre de 14,9 mm (Figure 96). La période de culture est de 3 et 6 jours sans changement de milieu. Les cellules sont détachées de leur support par trypsination et comptées dans un compteur de cellules Coulter Z1 (Figure 97). Le taux de prolifération relatif est exprimé en pourcentage \pm écart type de la culture témoin. Six expériences séparées seront effectuées sur 2 ou 3 échantillons pour chaque période d'exposition. Pour connaître le nombre de cellules à ensemercer dans chaque puits, un étalonnage préalable est réalisé. Nous déposerons, pour ces deux types cellulaires, 7×10^3 cellules par puits pour les essais de prolifération cellulaire avec les MC3T3-E1 et 10×10^3 cellules par puits avec les HUVEC³⁹⁸.

Les pastilles de titane testées ont été préalablement rincées à l'eau distillée dans un bain à ultrasons 2 fois 3 minutes puis immergées au moins 5 minutes dans l'éthanol sous la hotte avant d'être séchées durant au moins 1 heure sous la hotte.

Les cellules sont ensemençées dans des plaques multi-puits (24 puits de 15 mm de diamètre, Costar, Figure 96) contenant les échantillons.

A la fin des périodes d'incubation (3 et 6 jours) les cellules sont détachées des échantillons avec 0,3 mL de trypsine (0,1% (p/v) dans la solution Hank's sans Calcium et sans Magnésium) et une incubation de 10 minutes.

Les échantillons sont douchés à l'aide de 7,7 mL d'EDTA pour bien détacher les cellules du matériau. La suspension de 10 mL ainsi obtenue est bien homogénéisée à l'aide d'une pipette Pasteur par aspirations-rejets répétés.

La suspension cellulaire obtenue est comptée à l'aide d'un compteur cellulaire Coulter Z1 (Coultronics, Figure 97). Chaque suspension cellulaire est comptée 2 fois.



Figure 96 - Boîte de prolifération COSTAR®



Figure 97 - Compteur de Cellules (ZI Coulter)

Hémocompatibilité

Les tests réalisés en hémocompatibilité vont permettre de montrer les interactions entre la prothèse et le sang. Il est réalisé avec du sang humain sous 2 conditions de centrifugation (150G et 300G). Les manipulations sont réalisés avec du sang mélangé à du citrate pour inhiber la coagulation spontanée. Dans notre étude pour l'instant seul un test d'hémolyse a été

réalisé. Il constitue un des éléments constituant des normes ISO 10993-1 et ISO 10993-4^{40, 399} pour l'applicabilité d'un matériau à l'homme.

Protocole : test d'activité hémolytique d'échantillons solides

Préparation des échantillons

Préparer une surface de contact de 800mm² environs par échantillons,

Dans une plaque 6 puits (Iwaki®), placer un nombre de suffisants d'échantillons à tester pour obtenir la surface de contact désirée,

Ajouter 4mL de PBS filtré dans chaque puits avec les échantillons à tester, et dans un puits vide (Témoin négatif de l'hémolyse),

Ajouter 4mL de Na₂CO₃ dans un dernier puits vide (Témoin positif de l'hémolyse),

Incuber à 37°C, sous une agitation de 80rpm, pendant 15 minutes, permettant un conditionnement des échantillons.

Prélèvement du sang

Prélever une quantité de sang suffisante pour le test dans un tube hépariné.

Test de l'activité hémolytique

Ajouter 60µL de sang par puits,

Incuber à 37°C, sous une agitation de 80rpm, pendant 1h,

Collecter dans des tubes à hémolyse, le milieu de chaque puits,

Rincer avec 2mL de PBS, les puits contenant du PBS, en veillant à détacher les traces de sang,

Rincer avec 2mL de Na₂CO₃, les puits contenant du Na₂CO₃, en veillant à détacher les traces de sang,

Ajouter le liquide de rinçage aux tubes précédemment prélevés,

Centrifuger les tubes à 3250rpm, pendant 10min,

Mesurer l'absorbance les suspensions obtenues à 541nm.

Dégradation biologique en Milieu de culture: MEM - 10% sérum veau fœtal (SVF)

5 points de prélèvements: 0h, 8h, 24h, 72h, 120h (en accord avec les résultats de TBO réalisés à chaque temps, le protocole peut être adapté); 2 échantillons pour chaque temps sont nécessaires

- a) Un milieu de culture comprenant du MEM dans lequel 10% de SVF est ajouté a été préparé de manière stérile.
- b) les pastilles de CoCr sont stérilisées aux UV pendant 15 min
- c) les pastilles sont ensuite placées sous hotte dans des pots individuels où 2 mL de milieu enrichi avec 10% de SVF est ajouté; le pot est ensuite refermé de manière étanche et placé à 37°C sous agitation douce.
- d) A chaque point, la pastille est retirée du pot, transférée dans une plaque 12-puits et et rincée afin d'éliminer les traces de milieu restant.
- e) Les pastilles sont séchées obliquement durant une nuit ; la quantification TBO peut se faire le lendemain.

Annexe 2 – étude de la synthèse de NAS et du polymère de NAS***Synthèse et caractérisation du N-acryloyloxysuccinimide (NAS)***³¹⁰

Une solution de NHS (17,25 g, 15 mmol) et de triéthylamine (24,6 ml, 18 mmol) dans du chloroforme (CHCl₃, 240 ml) est placée sous atmosphère d'azote à 0°C. Le chlorure d'acryloyle (14,7 ml, 18 mmol) est alors ajouté goutte-à-goutte et le mélange réactionnel est laissé sous agitation pendant 4h à 0°C. La solution organique est lavée par une solution saturée de NaHCO₃ (3x50ml) puis séchée sur MgSO₄. Le CHCl₃ est évaporé et le produit est recristallisé dans un mélange éther diéthylique/hexanes (1 / 1) pour donner un solide blanc. Rendement: 21 g (82%).

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (ppm/TMS) : 2,79 (s, 4H, (C=O)-CH₂-CH₂-(C=O)), 6,3-6,8 (m, 3H, CH₂=CH).

Synthèses et caractérisations des (co)polymères**Homo-polymérisation RAFT : procédure générale**

Dans un tube Schlenk sont introduits l'agent de transfert, l'AIBN, le monomère de NAS et le solvant. Après dissolution des composés, la solution est purgée à l'azote pendant 30 min dans un bain de glace. Le tube Schlenk est ensuite placé dans un bain d'huile à température de polymérisation, sous agitation. Des échantillons sont prélevés à intervalles réguliers pour déterminer le taux de conversion par RMN-¹H, la masse molaire moyenne en nombre Mn et l'indice Đ par GPC. En fin de réaction, le polymère est précipité dans un non-solvant, ici le méthanol, sous forte agitation.

Ce protocole est identique pour les toutes les polymérisations RAFT en présence des agents de transfert synthétisés. Les différents paramètres propres à la polymérisation du NAS sont répertoriés dans le *Tableau 1*.

Monomère	Solvant	T (°C)	M] ₀ /[CTA] ₀ /[A] ₀	Monomère/Solvant	Non-Solvant
NAS	DMF	75	100/1/0,05	15/85	Méthanol
			50/1/0,05		

Tableau 1 - Paramètres de polymérisation RAFT et de précipitation pour le monomère de NAS [M]₀, [CTA]₀, [A]₀ : concentration initiale respectivement du monomère, de l'agent de transfert et de l'amorceur. Le rapport Monomère/Solvant est exprimé en pourcentage volumique.

Purification des polymères

Les polymères d'esters activés (pNAS) ont été purifiés en deux étapes. Les polymères sont dans un premier temps agités dans du chloroforme, solvant du monomère, pendant 1h puis filtrés. Les polymères sont dans un deuxième temps triturés dans de l'éther diéthylique, filtrés à nouveau et séchés sous vide.

Annexe 3 – Post-fonctionnalisation des polymères pNAS par la glucosamine

Les pNAS et le chlorhydrate de glucosamine NGluHCl ($[NGluHCl]_0/[NAS]_0 = 10, 20$ ou 40%) sont dissous dans la DMF à l'aide de 2,6-lutidine ($[lutidine]/[NGluHCl] : 2/1$). La solution, purgée sous azote, est portée à 60°C pendant une nuit avec agitation. La solution jaune claire est ramenée à température ambiante, puis de l'éthanolamine est ajoutée en excès en une fois et laissée à réagir 1h. La solution est filtrée et précipitée dans l'acétone. La poudre obtenue est séchée sous pression réduite dans une étuve à 50°C pendant 24h. Ils ont été caractérisés par RMN- ^1H (Figure 98).

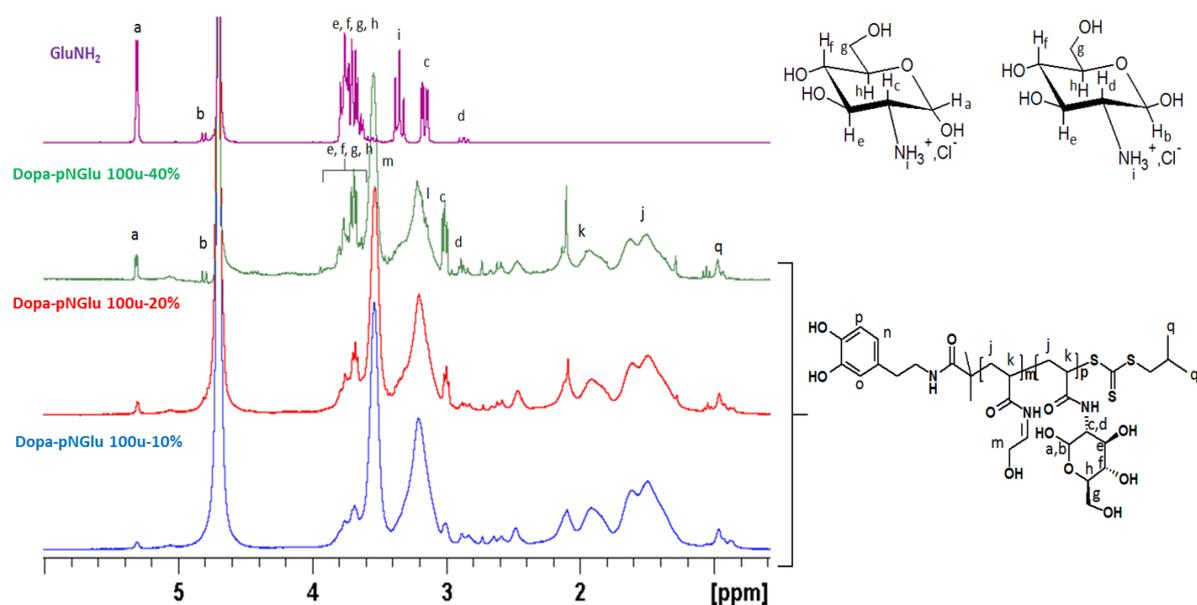


Figure 98 - Spectres RMN-1H du chlorhydrate de glucosamine et des polymères comportant différentes quantités de glucosamine

L'indice de polymolécularité a été défini par GPC après synthèse des polymères de NAS à 50 et 100 unités, ainsi qu'après post-fonctionnalisation du polymère de NAS à 100 unités par 3 taux différents de glucosamine ; ils sont tous faibles et compris entre 1,04 et 1,16 (Figure 99).

	\bar{M}_w
Dopamine-pNAS 50u	1,1584
Dopamine-pNAS 100u	1,1664
Dopamine-pNAS-Glu 100u-10%	1,0431
Dopamine-pNAS-Glu 100u-20%	1,1411
Dopamine-pNAS-Glu 100u-40%	1,1649

Figure 99 - Résultats des analyses GPC obtenus à partir du polymère soluble en fin de polymérisation déterminés par GPC DMF (équivalent PMMA)

Annexe 4 – Electrochimie / Voltampérométrie cyclique

1. Principe

La voltampérométrie cyclique consiste à enregistrer les courbes intensité-potential $i=f(E)$ donnant l'intensité du courant d'électrolyse i en fonction du potentiel E appliqué à une électrode de travail fixe inattaquable (en général en platine). La cellule d'électrolyse est ici composée de trois électrodes (*Figure 100*) :

- L'électrode de travail, un disque de platine ou de titane de dimensions connues, sur laquelle se produisent les réactions d'oxydation et de réduction.
- L'électrode auxiliaire, constituée d'un fil de platine, fermant le circuit d'électrolyse.
- L'électrode de référence, soit de type Ag/AgCl soit un fil d'argent, qui sert à mesurer le potentiel de l'électrode de travail.

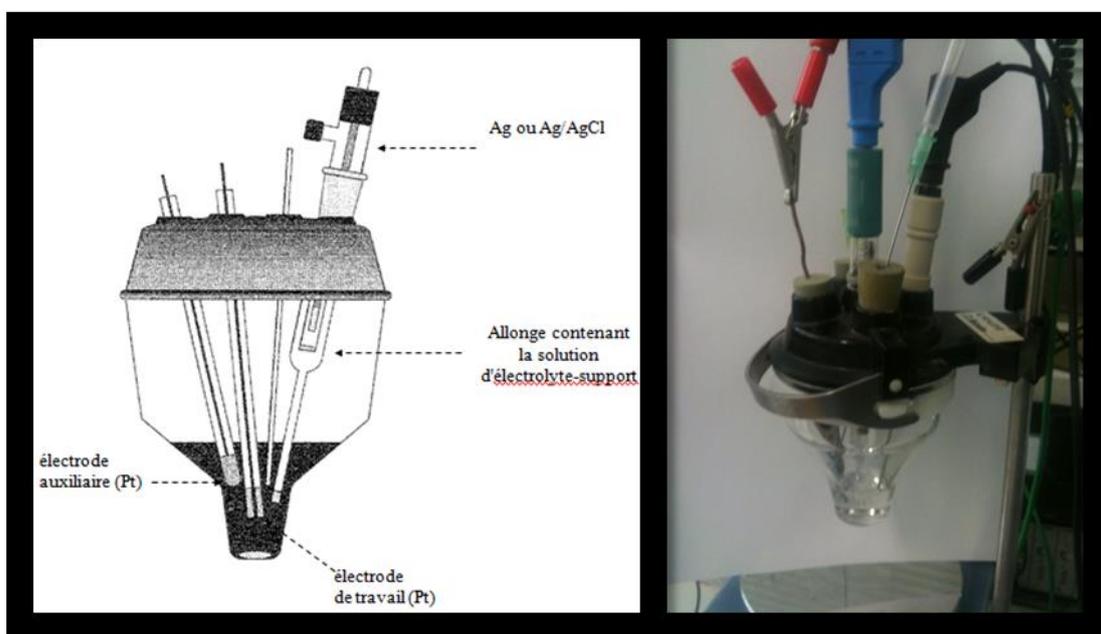


Figure 100 - Schéma et photo d'une cellule d'électrochimie

Le composé à analyser est dissous à $10^{-3} \text{ mol.l}^{-1}$ dans un solvant contenant un électrolyte-support de grande pureté à $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$. Il sert à conduire le courant au sein de la solution électrolytique. Le solvant doit être capable de dissoudre à la fois le composé à analyser et l'électrolyte.

Après un dégazage minutieux de la solution à l'argon ou à l'azote, la courbe $i = f(E)$ est enregistrée. Le balayage des potentiels est effectué à l'aller entre une tension initiale E_i et une tension finale E_f et au retour entre E_f et E_i .

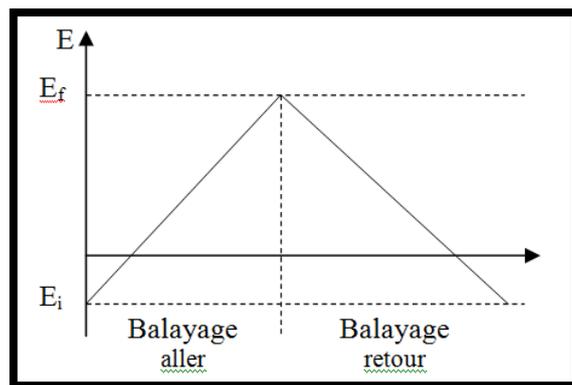


Figure 101- Evolution de la tension appliquée en fonction du temps lors d'un cycle de voltampérométrie

L'électrode de travail est fixe et aucune agitation n'a lieu dans la cellule. Par conséquent, l'apport des espèces électroactives vers l'électrode de travail se fait uniquement par diffusion. Dans ces conditions, la courbe $i=f(E)$ présente un pic de courant dû au fait que l'état stationnaire n'est pas atteint immédiatement à l'électrode (Figure 101).

2. Régimes de voltampérométrie cyclique

En **régime de diffusion** (cas standard), la valeur du courant de pic (i_p) est donnée par l'équation de Sevcik-Randles :

$$i_p = (2.69 \cdot 10^5) \cdot A \cdot n^{3/2} \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2}$$

Avec

i_p : courant de pic

A : surface de l'électrode

n : nombre d'électrons échangés dans la réaction d'électrode

D : coefficient de diffusion de l'espèce électroactive

C : concentration de l'espèce électroactive

v : vitesse de balayage

Donc, pour une électrode et une espèce électroactive à une concentration donnée :

$$i_p = k \cdot v^{1/2}$$

En **régime de couche mince**, la valeur du courant i_p est donnée par l'équation suivante :

$$i_p = (9.39 \cdot 10^5) \cdot n^2 \cdot V \cdot C \cdot v$$

avec

i_p : courant de pic

n : nombre d'électrons échangés dans la réaction d'électrode

V : volume de la couche

C : concentration de l'espèce électroactive

v : vitesse de balayage

Donc, dans ce cas, on a :

$$i_p = k.v$$

9. Résumé

Ce projet de thèse concerne les 2 principales complications rencontrées en pratique clinique dans les suites de l'angioplastie-stenting artériel : la resténose et la thrombose aiguë.

Pour remédier à ce problème, des stents enrobés d'agents antiprolifératifs sont déjà sur le marché, mais leurs résultats restent décevants en raison de l'augmentation du taux de thrombose tardive intrastent (RR 1,2 vs stent nu) à l'origine d'une surmortalité (RR 1,32 vs stent nu) [Lagerqvist Bo et al., *N Eng J Med* 2007]. Dans ce travail, nous proposons d'immobiliser sur le stent une ancre spécifique au substrat métallique soit pour immobiliser i) la molécule thérapeutique, soit pour immobiliser ii) une matrice polymère sur laquelle sera adsorbée une molécule thérapeutique dans le cas d'un système à libération prolongée; cette dernière ciblant la resténose et la thrombose.

Cette ancre, issue des protéines permettant l'accroche des moules marinières à tout type de substrat [Waite JH et al., *Science* 1981], est la base commune pour une immobilisation par liaisons covalentes de la molécule thérapeutique ou du système polymère. La première partie du projet concernait la mise au point de l'ancre chimique spécifique dans le cadre d'une immobilisation de surface.

Avec cette technique d'immobilisation, l'ancre dopamine inclue un ester activé, permettant de générer un polymère de longueur de chaîne contrôlée et capable d'adsorber une quantité contrôlée et définie de molécule thérapeutique [C Zobrist et al., *Macromolecules* 2011]. Ce polymère de *N*-(Acryloyloxy)succinimide a pu être caractérisé et couplé à une molécule de glucosamine, protéoglycane aux caractéristiques pertinentes dans la problématique développée. Ce modèle a été validé sur le plan chimique et biologique. Les résultats restaient décevants concernant la prolifération des cellules musculaires lisses qui sont les cellules cibles dans la resténose.

L'ancre dopamine a par la suite était polymérisée dans le but de permettre le greffage d'autres fonctions chimiques, notamment amines et acides. Cette polymérisation est obtenue en conditions basiques (pH 8,5) permettant d'obtenir une polydopamine [Lee et al., *Science* 2007].

Cette polydopamine a permis l'interaction sur la surface d'un polymère bien connu au sein de notre unité de recherche et déjà employé pour la fonctionnalisation des tissus dans le domaine biomédical, le polymère de cyclodextrine (CD) [Martel B et al., *European Polymer Journal* 1995]. Les CD sont des oligosaccharides cycliques sous forme de cône tronqué possédant une cavité hydrophobe interne et des groupements hydroxyles à l'extérieur engendrant un

caractère hydrophile. Cette structure cyclique leur confère la capacité de former des complexes d'inclusion réversibles avec un grand nombre de molécules hydrophobes. Elles peuvent donc stocker une molécule thérapeutique en grande quantité et ont la capacité de la libérer dans le temps.

L'ensemble des paramètres du procédé de fonctionnalisation permettant l'adsorption de ces 2 couches successives : polydopamine et polymère de CD a pu être optimisé. La complexation de deux molécules thérapeutiques d'intérêt à notre plateforme fonctionnalisée a pu être réalisée: la simvastatine et le paclitaxel. La simvastatine, de la famille des statines, est une molécule pléiotrope, régulatrice de la dysfonction endothéliale ; elle limite la réaction inflammatoire locale impliquée à la fois dans les phénomènes de resténose et de thrombose [Balk EM et al., *Am J Med.* 2004]. Le paclitaxel est un agent immunosuppresseur et antiprolifératif limitant la prolifération de la néointima [Creel CJ et al., *Circ Res* 2000]. Nous avons comparé notre plateforme avec un système actuellement sur le marché, le système PTX « polymer-free » mise au point par Dake et al. [Dake et al., *JVIR* 2011].

Le PTX comme la simvastatine complexe aussi bien avec la CD qu'avec le polymère de CD. Le revêtement de polydopamine et de polymère de CD permettent une libération plus longue de la molécule thérapeutique (simvastatine ou PTX). La première implantation d'un stent Co/Cr fonctionnalisé par la dopamine et le polymère de CD chargé de simvastatine dans un modèle de resténose dans une aorte de rat développé au sein de notre unité a donné des résultats encourageants ; le rat a survécu et sur l'analyse histo-morphométrique par rapport au témoin, la resténose était limitée.

Au final, nous sommes parvenus à mettre au point un système permettant de fonctionnaliser un revêtement métallique vasculaire à l'aide d'une molécule thérapeutique soit en l'immobilisant, soit en contrôlant sa libération dans le temps. Des études complémentaires chez l'animal détermineront son applicabilité et ses performances dans la problématique posée.

ABSTRACT

This work has focused on 2 major issues encountered after angioplasty and stenting of arterial occlusive disease: intra-stent restenosis and thrombosis.

To prevent these postoperative complications, drug eluting stents (DES) have been developed and are currently available for clinical use; they elute antiproliferative drugs overtime which limit smooth muscle cells migration and proliferation. Long-term results of DES are jeopardized by a high late in-stent thrombosis rate (RR 1.2 vs bare metal stent) which is

correlated to a higher late death rate (RR 1.32 vs bare metal stent) [*Lagerqvist Bo et al., N Eng J Med 2007*]. We present an original process of immobilization of a specific anchor on a metallic substrate which has the ability to directly immobilize drugs onto the metallic surface. It can also indirectly using specific biocompatible polymers load drugs onto the metallic surface which would be eluted overtime. The target for both systems is the cellular response involved in the restenosis and thrombosis process.

This specific anchor, which is dedicated to several substrates, is developed from marine mussels gel [*Waite JH et al., Science 1981*]. It is currently a common basis for covalent immobilization of drugs and/or polymer systems able to sustain drug release.

The first part of the project involved the development of a specific chemical anchor through an immobilization surface strategy. This dopamine anchor includes an activated ester, which is the starting point of the creation of a polymer with defined and controlled chain length. The generated polymer of *N*-(Acryloyloxy)succinimide has the ability to absorb a controlled and defined amount of drug; it has been linked with glucosamine to illustrate the potential of the system - glucosamine is a proteoglycan from the extracellular matrix of the arterial wall. The system has then been characterized and optimized for every parameters; unfortunately, results were not as good as expected regarding SMC proliferation.

The Dopamine anchor has thus been modified to allow interactions with more chemical functions, including amino- and carboxylic functions. Finally, we used it under alkaline conditions (pH=8.5) where dopamine generated a network of polydopamine [*Lee et al., Science 2007*].

Afterwards, we report an original functionalization of metallic surfaces with a hydrophilic, biocompatible and biodegradable cyclodextrin based polymer. This polymer acts as a reservoir for hydrophobic drugs allowing the sustained release of anti-proliferative drugs and promotes natural arterial wall healing. The polymer of CD is well-known in our research department and has already been used as an active coating onto textile for vascular devices [*Martel B et al., European Polymer Journal 1995*]. In this setting polydopamine was applied as a first coating layer onto the metallic surface in order to promote a strong anchorage of a cyclodextrin based polymer that was “in situ” generated from the native cyclodextrins and citric acid as a crosslinking agent through a polycondensation reaction. After optimization of the grafting process, the ability of this system to act as a drug eluting system was evaluated with paclitaxel (PTX) and simvastatine. PTX is a reference drug for current vascular drug eluting stents [*Creel CJ et al., Circ Res 2000*]. PTX is currently coated on vascular stents with a “polymer-free” method [*Dake et al., JVIR 2011*]. It is a highly lipophilic antiproliferative

drug, and that “polymer-free” system was compared as a positive control to our functionalized scaffold. We compared the results of our functionalized surface loaded of PTX and Simvastatin. Simvastatin is a pleiotropic molecule with targeted actions on arterial disease, inflammatory process and dyslipidemia [*Balk EM et al., Am J Med. 2004*].

PTX and simvastatine complexed well with CD and CD based polymers. The release kinetic profiles show longer elution with our functionalized platform in comparison with the “polymer-free” system.

The first implantation of a functionalized Cobalt-Chromium stent loaded with simvastatine has been performed in the aorta of a rat. After 28 days, the implanted rat was still alive and histomorphometric analyses showed reduction in restenosis.

This work has reached its objective; we developed two strategies presenting anti-restenotic drugs within the endoluminal space by immobilization or elution.

Further animal studies will determine its application and its potential related to prevent restenosis and thrombosis after intra-arterial angioplasty and stenting.

Mots-clés

Stents vasculaires actifs, dopamine, cyclodextrine, resténose, cytocompatibilité