



*Université Paris Nord – Institut Galilée
Laboratory for Vascular Translational Science – INSERM U1148*

THESE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS NORD
Discipline : Sciences de l'ingénieur
Mention Génie biologique et médical

**Mise au point et évaluation de nouveaux revêtements
de stents pour application cardio-vasculaire.**

Présentée et soutenue publiquement par

Cécilia DELATTRE

Le 9 novembre 2015

Directeur et Co-directeur de Thèse : Dr. Didier Letourneur et Pr. Anne Pellé

Membres du jury

Pr Christelle Jaffré	Rapporteur
Pr Emmanuel Pauthe	Rapporteur
Pr Catherine Boisson Vidal	Examineur
Pr. Anne Pellé	Examineur
Pr. Didier Letourneur	Directeur de thèse

*En essayant continuellement
on finit par réussir.
Donc : plus ça rate,
plus on a de chance que ça marche.*

*Les Shadoks
Jacques Rouxel*

REMERCIEMENTS

Ce travail a été principalement réalisé dans le laboratoire des sciences vasculaires translationnelles, INSERM U1148, de l'université Paris 7 et Paris 13, sous la direction du Dr Didier Letourneur et du Pr Anne Pellé. J'exprime ma profonde gratitude à Jean-Baptiste Michel, ancien directeur de cette unité, pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire et à Didier Letourneur pour m'avoir confié ce travail de recherche et son accueil au sein de l'équipe de bioingénierie cardiovasculaire.

En premier lieu, mes plus sincères remerciements à Anne Pellé pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour son expertise, pour avoir su m'encadrer tout en me laissant une certaine autonomie et pour son soutien et ses conseils.

Merci Catherine Boisson-Vidal pour avoir accepté de faire partie du jury, avoir accompagné ce travail, avoir été l'œil extérieur qui a permis le recul et la remise en question et pour son écoute attentive. Merci également de m'avoir accueilli au sein de l'unité de thérapies innovantes en hémostase, INSERM U1140, pour les expériences cellulaires. J'en profite pour remercier au passage Anna Lokajczyk ainsi que les membres de cette unité qui m'ont aidé.

Je remercie vivement le Pr Christelle Jaffré et le Pr Emmanuel Pauthe pour avoir accepté d'être rapporteur et pour le temps passé à examiner ce manuscrit. Leurs commentaires et remarques constitueront un précieux concours.

Toute ma gratitude à la Société Française de Cardiologie, la Fédération Française de Cardiologie et le Groupement de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire pour leur financement mais aussi pour l'accueil chaque année au Printemps De La Cardiologie qui permet des échanges avec des personnes extérieures au projet.

Un très grand merci à Caroline Roques pour son encadrement au quotidien, pour m'avoir accompagné dans mes premiers pas de recherches et de paillasse, pour les longues conversations scientifiques et privées et pour son soutien dans les phases de doute.

Merci également à l'équipe de Villetaneuse, où j'ai passé les 6 premiers mois de thèse, pour leur aide sur la partie synthèse. Je pense particulièrement Graciela Pavon-Djavid pour la partie bactérie et ces nombreuses autres contributions, à Diego Velasquez pour le travail sur la libération de principe actif, Mohammed Derkaoui, Virginie Gueguen, Amélie Labbé et Thierry Avramoglou pour leur aide sur la synthèse.

Je remercie Martine Jandrot-Perrus et son équipe spécialement Véronique Ollivier et Stéphane Loyau pour leurs aides, disponibilités et conseils avisés dans la partie hémocompatibilité.

Je remercie tous ceux qui m'ont aidé et enseigné pour l'expérimentation animale : Liliane Louedec, pour ses aides multiples, mais aussi Michael Atlan, Martin Rouer et Marie Bensussan.

Je n'oublie pas de remercier ceux grâce à qui j'ai eu plaisir à venir au labo et qui ont permis une bonne ambiance : le « 3^{ème} étage ». Je pense particulièrement à Cédric qui

malgré n'avoir jamais compris les règles de TLMSP, m'a accordé beaucoup de temps pour discuter et me remotiver. Merci Rachida, Julia, Solène, Maya, Pierre, Catherine, Thomas, Valentin et les autres. Merci aussi à Corinne de m'avoir expliqué à maintes reprises comment passer mes commandes qui ne rentraient jamais dans les cases.

Enfin merci à mes proches qui m'ont accompagnés et ont subi cette période. Merci à Roger, mon parachute, qui m'a permis de m'aérer et surtout aux amis qui l'accompagnent dont Sylvain. Merci à Anna et mes boquets ! Merci à Philippe de m'avoir supportée et épaulée durant cette phase de rédaction. Ma dernière pensée va à ma famille, mon frère et mes parents qui j'en suis sûre seront les plus soulagés que cette thèse soit enfin terminée.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	i
SOMMAIRE	iii
TABLE DES ILLUSTRATIONS	vii
LISTE DES ABREVIATIONS	ix

INTRODUCTION GENERALE **3**

CHAPITRE 1 BIBLIOGRAPHIE **5**

1. PROBLEMATIQUE CLINIQUE : LA STENOSE CORONAIRE	7
1.1. LES ARTERES CORONAIRES : QUELQUES ELEMENTS ANATOMIQUES ET PHYSIOLOGIQUES	7
1.2. LE TISSUS SANGUIN	8
1.3. LA PATHOLOGIE OBSTRUCTIVE DES ARTERES CORONAIRES OU STENOSE	10
2. PRISE EN CHARGE CLINIQUE	10
2.1. LE PONTAGE	10
2.2. L'ANGIOPLASTIE	11
2.3. LES LIMITATIONS DE CETTE TECHNIQUE	12
2.3.1. La resténose intra-stent	13
2.3.2. La thrombose tardive intra-stent	13
2.3.3. Infection sur prothèse	13
3. LES ENDOPROTHESES METALLIQUES OU « STENT »	14
3.1. LES PREMIERS STENTS	14
3.2. LES ALLIAGES CONSTITUANT LA STRUCTURE METALLIQUE	15
3.3. GEOMETRIE ET FLUX	18
3.4. PREMIERE GENERATION DE STENTS : LES STENTS NUS	20
3.5. DEUXIEME GENERATION DE STENTS	20
3.5.1. Les revêtements inorganiques	20
3.5.2. Revêtements actifs	21
3.6. STENTS ET RECHERCHES ACTUELLES	32
4. LE DEVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF MEDICAL IMPLANTABLE (DMI), ASPECTS REGLEMENTAIRES	36
4.1. LE DM, DEFINITION	36
4.2. REGLEMENTATION	36
4.3. BIOCOMPATIBILITE	38
4.3.1. Définition	38
4.3.2. Évaluation in vitro	40
4.3.3. Évaluation in vivo	42
4.4. HEMOCOMPATIBILITE D'UN MATERIAU	44
4.4.1. L'hémostase	44
4.4.2. Les tests	46
5. DEVELOPPEMENT DE NOUVEAUX REVETEMENTS	47
5.1. COPOLYMERE DE DEXTRANE-POLY(BUTHYLE METHACRYLATE)	47
5.1.1. Le dextrane	47

5.1.2. Le PBMA	47
5.1.3. La polymérisation radicalaire	47
5.2. RESULTATS PRELIMINAIRES	48
5.2.1. Caractérisation physico-chimique	49
5.2.2. Tests in vitro	50
6. BILAN ET MISE EN PERSPECTIVE	51
CHAPITRE 2 PARTIE EXPERIMENTALE	53
1. CADRE ET OBJECTIFS	55
2. MATERIELS ET METHODES	56
2.1. SYNTHESSES ET MISE EN FORME DES POLYMERES	56
2.1.1. Matériel	56
2.1.2. La synthèse des polymères	56
2.1.3. Mise en forme des matériaux	58
2.2. CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE	59
2.2.1. Infrarouge à transformée de Fourier	59
2.2.2. Mesure d'angle de contact	60
2.2.3. Résistance du revêtement sous flux	60
2.3. EVALUATION <i>IN VITRO</i>	61
2.3.1. Adhésion bactérienne	61
2.3.2. Hémostabilité	61
2.3.3. Interactions avec les cellules circulantes	63
2.4. DELIVRANCE D'UN PRINCIPE ACTIF <i>EX VIVO</i>	65
2.4.1. Mise au point du système	65
2.4.2. Dosage du TAC libéré	65
2.5. EVALUATION <i>IN VIVO</i>	66
2.5.1. Implantation chez le rat	66
2.5.2. Modèle de resténose chez le lapin	67
2.5.3. Analyse des prélèvements	68
2.6. STATISTIQUES	69
3. RESULTATS ET DISCUSSION	70
3.1. SYNTHESSES ET MISE EN FORME DES ECHANTILLONS	71
3.1.1. PBMA	71
3.1.2. Dex-PBMA et Dex-PBMA'	71
3.1.3. Mise en forme	72
3.2. ETAPE 1 : SELECTION DU COPOLYMERE	73
3.2.1. Caractérisation	73
3.2.2. Réaction à corps étranger	75
3.3. ETAPE 2 : ANALYSE DU REVETEMENT DEX-PBMA	78
3.3.1. Caractérisations du copolymère retenu	79
3.3.2. Hémostabilité	81
3.3.3. Interactions avec les cellules circulantes	85
3.3.4. Dex-PBMA comme plateforme de libération de substances	87
3.3.5. Implantation in situ chez l'animal	89

CHAPITRE 3 CONCLUSIONS	95
CHAPITRE 4 VALORISATION DES TRAVAUX DE THESE	101
1. PUBLICATION	103
2. PRESENTATIONS ORALE ET POSTER	117
2.1. PRINTEMPS DE LA CARDIOLOGIE 2013	117
2.2. JOURNEE DE L'ECOLE DOCTORALE GALILEE 2013	119
2.3. EUROPEAN CONFERENCE OF BIOMATERIALS 2013	120
2.4. PRINTEMPS DE LA CARDIOLOGIE 2014	122
3. ARTICLE DE PRESSE	124
REFERENCES	125

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Vascularisation du cœur (Sanofi-Adventis France ©)	7
Figure 2 : Structure d'une artère de moyen calibre (D'après Sanofi-Adventis France ©)	8
Figure 3 : Eléments figurés du sang.....	9
Figure 4 : Flux sanguin (d'après la NIH).....	10
Figure 5 : Schéma d'un pontage coronarien (d'après Larousse Médical)	11
Figure 6 : Principe de l'angioplastie (d'après la NIH).....	11
Figure 7 : Pose d'un stent après PTCA (adaptée de la NIH).....	12
Figure 8 : Resténose intra-stent	13
Figure 9 : Thrombose intra-stent ⁷	13
Figure 10 : Premiers stents endovasculaires.....	14
Figure 11 : Courbe de traction	15
Figure 12 : Propriétés du Nitinol	16
Figure 13 : Forces et flux sanguin.....	19
Figure 14 : Maillage des stents.....	19
Figure 15 : Molécules éluées par les DES	22
Figure 16 : Modèle de cinétique de libération ⁵⁰	24
Figure 17 : Stratégies originales de DES ^{66,68}	26
Figure 18 : Recouvrement des DES et BMS 14 jours après implantation ¹⁰⁶	30
Figure 19 : Images MEB de différents revêtements de stent ^{107,108}	31
Figure 20 : Malposition de stent	31
Figure 21 : Balance dégradation/Intégrité mécanique (adapté de Sun et al.) ⁶²	32
Figure 22 : Parcours d'un DMI (d'après Cudennec) ¹²⁰	37
Figure 23 : Intéractions tissus-biomatériau d'après Schoen ¹²²	39
Figure 24 : Progression morphologique d'une réaction à corps étranger ¹²⁴	40
Figure 25 : Formation du clou plaquettaire (d'après Borissoff et al.) ¹²⁹	44
Figure 26 : Cascade de la coagulation	45
Figure 27 : Dextrane	47
Figure 28 : Butyle Méthacrylate.....	47
Figure 29 : Caractérisation du Dex-PBMA	49
Figure 30 : HUVEC et VSMC sur une surface 316L recouverte de Dex-PBMA ou nue.....	50
Figure 31 : Objectifs généraux de PRESTIGE	51
Figure 32 : Schéma de la stratégie de l'étude	55
Figure 33 : Réaction de greffage (D'après Derkaoui et al.) ¹³³	57
Figure 34 : Etapes de la synthèse des Dex-PBMA	58
Figure 35 : Enceinte de revêtement d'un mini-cristallisateur	59
Figure 36 : Mesure d'angle de contact.....	60
Figure 37 : Système d'évaluation de résistance sous flux.....	60
Figure 38 : Courbe type de génération de thrombine.....	63
Figure 39 : Système de perfusion ex vivo	65
Figure 40 : Dosage du tacrolimus.....	66
Figure 41 : Protocole d'implantation d'un stent dans l'aorte abdominale du rat.....	67
Figure 42 : Mesures des différentes aires sur une coupe HE	69
Figure 43 : Réalisation du projet	70
Figure 44 : Rendements des synthèses de Dex-PBMA et Dex-PBMA'	71
Figure 45 : Echantillon après revêtement par le Dex-PBMA	72
Figure 46 : Spectres FTIR du Dex-PBMA, Dex-PBMA', PBMA et dextrane.....	73
Figure 47 : Angle de contact.....	74

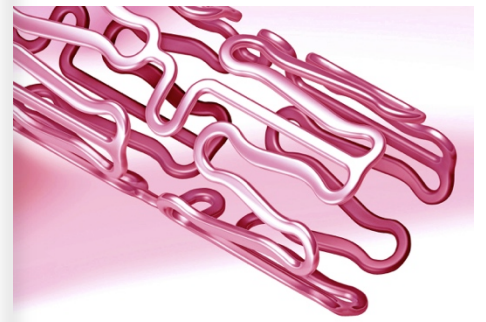
Figure 48 : Analyses histologiques des films de Dex-PBMA et Dex-PBMA'	76
Figure 49 : Evolution de l'épaisseur de la chape cellulaire	77
Figure 50 : MEB de stents recouverts de Dex-PBMA ayant passé 7 jours dans l'eau	79
Figure 51 : Adhésion bactérienne	80
Figure 52 : Quantification de l'adhésion des plaquettes en conditions statiques	81
Figure 53 : Observation au MEB des plaquettes après adhésion en condition statique	82
Figure 54 : Adhésion des plaquettes en conditions dynamiques	83
Figure 55 : Adhésion cellulaire sur des disques CoCr et Dex-PBMA	85
Figure 56 : Prolifération cellulaire sur des disques CoCr et Dex-PBMA	86
Figure 57 : Libération du tacrolimus par le Dex-PBMA _{TAC}	88
Figure 58 : Implantation de stent Dex-PBMA et CoCr chez le rat	90
Figure 59 : Implantation de stent Dex-PBMA, Dex-PBMA _{TAC} et CoCr chez le lapin.....	92

Tableau 1 : Cahier des charges non exhaustif d'un matériau de stent	15
Tableau 2 : Composition des alliages SS 316L et CoCr L-605	18
Tableau 3 : Propriétés mécaniques des principaux alliages de stent	18
Tableau 4 : Revêtements inertes et études cliniques (adapté de O'Brien et al.) ⁴¹	21
Tableau 5 : Cahier des charges d'un revêtement de DES (d'après Parker et al.) ⁵²	23
Tableau 6 : Exemple de DES	27
Tableau 7 : Etudes cliniques sur les DES	28
Tableau 8 : Propriétés mécaniques de différents matériaux de BDS.....	32
Tableau 9 : BRS testés ou en cours d'évaluation clinique ^{66,116}	35
Tableau 10 : Norme ISO 10993	38
Tableau 11 : Propriétés du Dex-PBMA.....	49
Tableau 12 : Quantité de réactifs dans la réaction de greffage du Dex-PBMA.....	57
Tableau 13 : Récapitulatif supports et expériences.....	58
Tableau 14 : Composition des tampons d'adhésion des plaquettes en statique	61
Tableau 15 : Bilan des synthèses Dex-PBMA et Dex-PBMA'	71
Tableau 16 : Analyse des spectres FTIR	74
Tableau 17 : Génération de thrombine	83

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AA	Acide adipique
ACD-A	Trisodium citrate acid-citric-dextrose
A _F	Température de disparition de la phase martensitique
AIBN	L'α,α'-azobisisobutyronitrile
AMF	Alliage à Mémoire de Forme
ANSM	Agence National de Sécurité du Médicament et des produits de Santé (française)
A _S	Température d'apparition de la phase austénitique
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BDS	Stent biodégradable – <i>BioDegradable Stent</i>
BMA	Butyle Méthacrylate
BMS	Stent métallique non recouvert – <i>Bare Metal Stent</i>
BSA	Albumine de sérum bovin – <i>Bovin Serum Albumin</i>
BVS	Stent résorbable – <i>Bioresorbable Vascular Scaffold</i>
CE	Cellule Endothéliale
CML	Cellule Musculaire Lisse
CoCr	Alliage Cobalt-Chrome
CTRL	Contrôle
DES	Stent à élution médicamenteuse – <i>Drug Eluting Stent</i>
Dex-PBMA	Copolymère de Dextrane et PBMA
Dil-AcLDL :	LDL acétylés marqués au perchlorate 1,1'-dioctadecyl – 3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine
DLPLA	D-lactic polylactide
DMI	Dispositif Médical Implantable
DTE	Desaminotyrosyl-tyrosine ethyl ester
E	Module d'Young
EC	Cellule endothéliale – <i>Endothelial Cell</i>
ECFC	Cellules endothéliales formant des colonies – <i>Endothelial colony-forming cell</i>
EFS	Etablissements Français du Sang
FDA	Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux – <i>Food and Drug Administration</i>
FIM	Première étude clinique chez l'homme – <i>First In Man</i>
FT	Facteur Tissulaire
FTIR	Infrarouge à transformée de Fourier – <i>Fourier Transform InfraRed Spectroscopy</i>
GP	GlycoProtéine
HE	Hématoxyline Eosine
HT	HysTérésis
HUVEC	Cellule endothéliale de vaine de cordon ombilicale – <i>Human Umbilical Endothelial Cell</i>
I ₂ DT	desaminotyrosyl-tyrosine iodé
I ₂ DTE	ester éthylique iodé de DTE
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
ISO	Organisation international de normalisation – <i>International Organization for Standardization</i>
IVUS	Echographie intravasculaire – <i>IntraVascular UltraSound</i>
KBr	Bromure de potassium
LAL	Lysat d'améboocytes de limules
LDL	Lipoprotéine de basse densité – <i>Low Density Lipoproteins</i>
LST	Thrombose tardive sur stent – <i>Late Stent Thrombosis</i>

LT	Temps de latence en génération de thrombine – <i>LagTime</i>
MACE	Effets secondaires cardiaques majeurs – <i>Major Adverse Cardiac Events</i>
MEB	Microscopique Electronique à Balayage
M _F	Température de disparition de la phase austénitique
M _S	Température d'apparition de la phase martensitique
MSC	Cellule souche mésenchymateuse – <i>Mesenchymal Stem Cell</i>
NIH	Instituts américains de la santé – <i>National Institutes of Health</i>
NiTi	Nitinol
OCDE	Organisation de Coopération et Développement Economique
<i>p</i>	Pression artérielle
PAE	Poly-anhydride ester
PBMA	Poly(butyl methacrylate)
PBS	Tampon phosphate salin – <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Phosphorylcholine
PEC	Progéniteur Endothélial Circulant
PEG	Polyethylene glycol
PEVA	Poly(ethylene-co-vinyl-acetate)
PGE1	Prostaglandine E1
PGL	Polyglycolide
PLCL	Poly lactide-co-caprolactone
PLGA	Poly-D-L-lactide-co-glycolide
PLLA	Poly-L-lactide
PMMA	Poly(methyl methacrylate)
PPP	Plasma Pauvre en Plaquettes
PRP	Plasma Riche en Plaquettes
PTCA	Angiographie coronarienne transluminale percutanée – <i>Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty</i>
PtCr	Alliage Platine-Chrome
PVDF-HFP	Poly(vinylidene fluoride-co-hexafluoropropylene)
PVP	Poly(vinyl pyrrolidone)
Re	Limite élastique
Rm	Résistance à la traction
RT	Température ambiante – <i>Room Temperature</i>
SA	Acide salicylique
SIBS	Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)
SR	Resténose intra-stent – <i>Stent Restenosis</i>
SS	Acier inoxydable – <i>Stainless Steel</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TAC	Tacrolimus
Tg	Température de transition vitreuse
THF	Tetrahydrofurane
TLR	Nouvelle angioplastie de la lésion traitée – <i>Target Lesion Revascularisation</i>
tPeak	Temps pour atteindre le pic de concentration en génération de thrombine
VI	Index de vitesse en génération de thrombine – <i>Velocity Index</i>
VSMC	Cellule musculaire lisse vasculaire – <i>Vascular Smooth Muscle Cell</i>
vWF	Facteur de Von Willebrand
WP	Work Package
σ_c	Contrainte seuil
τ	Force de cisaillement



INTRODUCTION GÉNÉRALE

D'après la Société Européenne de Cardiologie, l'espérance de vie à 65 ans de la population européenne est passée de 15 ans en 1980 à 17 ans en 2008. Dans les pays développés, jusqu'à 50% des séniors décèdent d'une maladie cardiovasculaire, majoritairement d'une maladie coronarienne telle l'athérosclérose. Cette pathologie se manifeste par la formation de plaques dans la paroi des artères, familièrement connues sous le nom de « plaques de cholestérol ». L'épaississement de ces plaques ou leur rupture entraînant la libération de débris dans la circulation peuvent conduire à la diminution ou l'obstruction de l'écoulement sanguin : c'est l'ischémie. Le plus souvent au niveau des artères coronaires, des carotides et des artères des membres inférieurs, ces ischémies aboutissent respectivement à des infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou des artérites oblitérantes des membres inférieurs. De plus, l'apparition des symptômes se faisant en moyenne vers 50 ans, une tranche active, au sommet de sa productivité, est touchée ce qui fait de cette pathologie une problématique socio-économique.

Une étude sur des momies datant de 3 100 ans avant Jésus-Christ issues de milieux géographiquement et climatiquement distincts, aux modes de vie différents, a cependant révélé la présence non négligeable de plaques d'athérome, de 25 à 60 % selon la population.¹ Ceci démontre donc que l'athérosclérose n'est pas un héritage inéluctable de l'industrialisation et l'urbanisation. Cependant, la sédentarité et une surcharge pondérale sont, avec le tabagisme, les principaux facteurs de risque. En deuxième ligne, viennent l'hérédité cardiovasculaire et le stress.

La prévention primaire de l'athérosclérose vise à améliorer l'hygiène de vie et consiste à lutter contre les facteurs de risques cardiovasculaires : hypercholestérolémie, surpoids, hypertension artérielle. Chez les personnes à hauts risques cardiovasculaires ou après un premier accident ischémique, des statines sont administrées pour réduire le taux de lipoprotéines de basse densité (LDL) transportant le cholestérol et stabiliser les plaques. Néanmoins, dans certain cas, lorsque les plaques sont trop développées, la chirurgie est inévitable. Actuellement, le traitement le plus efficace de l'obstruction coronarienne est l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée suivie d'une pose de stent. Le succès de cette intervention est illustré par sa fréquence, son nombre en Europe ayant été plus que quadruplé entre 1992 et 2004 (184 000 vs 885 000).

Cette opération consiste dans un premier temps à écraser la plaque avec un ballonnet acheminé au niveau de la lésion, depuis l'artère fémorale ou l'artère radiale, via le réseau artériel. Le diamètre de cette dilatation est dans un second temps maintenu par le déploiement d'une structure tubulaire grillagée : un stent. Cependant, suite à cette intervention l'endothélium est endommagé. L'artère étant dénudée de sa couche protectrice, un environnement thrombogénique est favorisé. Chez environ un tiers des patients, les cellules de la paroi artérielle stimulées mécaniquement par la dilatation prolifèrent et induisent une nouvelle occlusion de l'artère coronaire : c'est la resténose.

Afin de réduire l'occurrence de cette complication une deuxième génération de stents a été développée. Les implants ont été enduits de molécules pharmaco-actives visant à limiter la prolifération néo-intimale. Ces stents actifs ont répondu à l'attente de diminution des cas de resténose mais de manière concomitante des retards de réendothélialisation ont été notés aboutissant dans 2% des cas à des saignements plus d'un mois après l'intervention : il s'agit de la thrombose tardive sur stent. Cette complication aboutissant dans un cas sur deux au décès du patient, elle n'est pas à négliger. L'ensemble des mécanismes impliqués dans la thrombose tardive n'étant pas clairement identifié il est difficile d'y apporter une réponse efficace. Cependant, de nombreuses pistes sont explorées pour mettre au point des stents plus performants limitant à la fois la resténose et la thrombose tardive.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon projet doctoral. Au sein de l'équipe *Cardiovascular Bioengineering* de l'unité INSERM U1148 *Laboratory for Vascular Translational Science* rattachée aux Universités Paris 13 et Paris 7 a été développé un copolymère à base de dextrane et de polybutylméthacrylate. Ce polysaccharide associé à un polymère synthétique présente des propriétés mécaniques adaptées au revêtement de stent et a montré *in vitro* des propriétés intéressantes.² L'objectif de mon travail était donc de poursuivre le développement et l'analyse de ce matériau afin de l'utiliser comme revêtement de stent cardiovasculaire.

Ce manuscrit se présente en quatre chapitres. Dans un **premier chapitre bibliographique**, nous fournirons quelques éléments de la problématique et prise en charge clinique nécessaires à la bonne compréhension de la suite. Puis, nous présenterons les contraintes et l'évolution des stents ainsi que les aspects réglementaires de développement d'un dispositif médical implantable. Enfin les résultats préliminaires sur les copolymères étudiés seront exposés.

Dans le **deuxième chapitre**, nous détaillerons les travaux expérimentaux réalisés au cours de la thèse. Cette étude se divise en deux étapes : une première étape d'optimisation de la synthèse et de choix de la composition du copolymère, suivie d'une seconde étape de validation notamment vis à vis de la resténose et thrombose. Les résultats seront exposés et discutés.

Enfin, un **troisième chapitre** de conclusion et mise en perspective du travail effectué précèdera le **quatrième chapitre** où la valorisation de ces travaux sera récapitulée.

CHAPITRE

1

BIBLIOGRAPHIE

1. Problématique clinique : la sténose coronaire

1.1. Les artères coronaires : quelques éléments anatomiques et physiologiques

Les artères **coronaires** sont situées à la surface du cœur (Figure 1). Elles alimentent le muscle cardiaque. Prenant naissance dans l'aorte thoracique l'artère coronaire gauche se ramifie en l'artère interventriculaire antérieure et en l'artère circonflexe et la droite en l'artère interventriculaire postérieure et l'artère rétroventriculaire. Leur calibre proximal est de 2 à 3 mm.

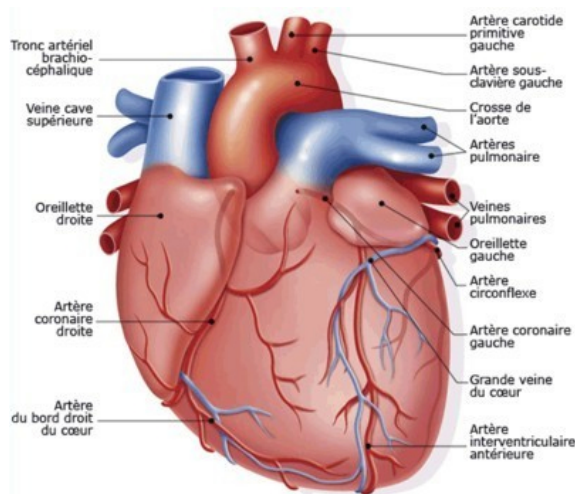


Figure 1 : Vascularisation du cœur (Sanofi-Adventis France ©)

D'une manière générique, la paroi artérielle est constituée de trois tuniques concentriques qui, de l'extérieur vers l'intérieur, sont l'**adventice**, la **média**, et l'**intima** (Figure 2).

L'**adventice** est la tunique la plus externe. Plus le calibre du vaisseau est important, plus elle est développée et épaisse. Elle est composée d'un tissu conjonctif dense et peu organisé, riche en collagène, fibres élastiques, fibroblastes et adipocytes. Elle assure l'ancrage du vaisseau aux tissus environnants et augmente la solidité de la structure artérielle. Lorsque le diamètre de l'artère est suffisamment important, son adventice contient des vaisseaux « propres », ou *vaso vasorum*, qui l'irrigent ainsi que des vaisseaux lymphatiques et des fibres nerveuses.

La **média** est la tunique intermédiaire. Elle est constituée de couches concentriques d'unité lamellaires formées de **lisses cellules musculaires** (CML) associées à des constituants extracellulaires (fibres et fibrilles élastiques, faisceaux et fibrilles de collagène) ainsi que des mucopolysaccharides. Dans les artères de moyen ou petit calibre comme les coronaires, la média est séparée de l'adventice et de l'intima par deux **limitantes élastiques** respectivement qualifiées d'externe et d'interne. Elle participe aux propriétés vasomotrices, contraction et dilatation, de l'artère.

L'**intima** est la tunique la plus interne et la plus fine de la paroi artérielle. Elle délimite la **lumière** dans laquelle le sang circule. Elle est constituée d'une monocouche de **cellules**

endothéliales (CE) formant l'**endothélium** qui repose sur un tissu conjonctif fibroélastique : la **lame basale**. L'endothélium est en contact direct avec le sang et est impliqué dans le maintien de nombreux mécanismes tel la régulation du tonus vasculaire ou la régulation de la prolifération des CML. A l'état non pathologique il exprime à la surface des molécules anticoagulantes comme le facteur de von Willebrand et est recouvert d'une mince couche de protéoglycanes chargés négativement : le **glycocalyx**. Cet épithélium du fait de sa structure pavimenteuse est sensible aux perturbations de flux et notamment aux forces de cisaillement qu'il subit. Lorsqu'il est endommagé, les cellules endothéliales sont alors dites activées, elles peuvent dès lors sécréter des molécules qui vont encourager la migration des CML ou inhiber l'effet anticoagulant. L'endothélium devient alors perméable, laissant passer des molécules ou des cellules dans la paroi artérielle.³

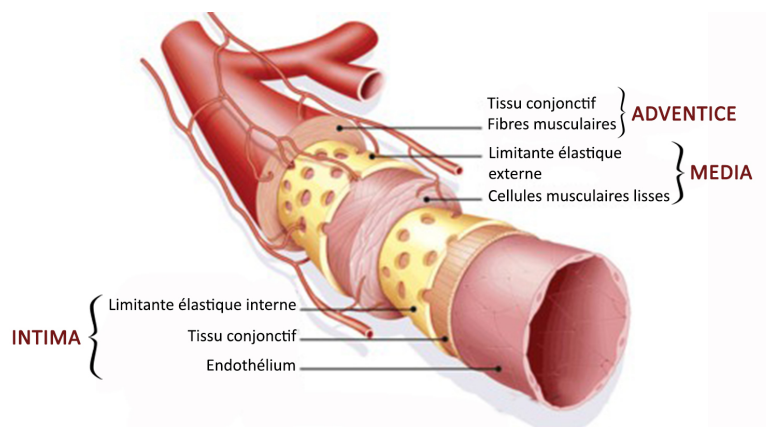


Figure 2 : Structure d'une artère de moyen calibre (D'après Sanofi-Adventis France ©)

1.2. Le tissu sanguin

A l'intérieur des artères circule en permanence le sang, un **tissu conjonctif** fluide, dont la fonction est d'alimenter les autres tissus en dioxygène et éléments nutritifs et d'éliminer les déchets vers les organes d'évacuation que sont les reins, les poumons, le foie et les intestins. Il achemine également les hormones et les cellules du **système immunitaire** dans tout l'organisme et contribue au maintien du pH et de la température corporelle.

Le sang représente environ 8 % du poids corporel, soit environ 5 L pour un individu sain et est composé de 45 % d'**éléments figurés** en suspension dans du **plasma**.

Le **plasma** est un liquide aqueux visqueux contenant 10% de solutés dont des sels, des nutriments, des gaz dissous, des hormones et des protéines telles que l'albumine, les globulines, le **fibrinogène** et les **facteurs de coagulation**.

Les **éléments figurés** sont les **érythrocytes**, les **leucocytes** et les **thrombocytes**.

Les érythrocytes ou **globules rouges**, 4 à 6 billions par litre de sang, sont de petites cellules anucléées biconcaves (Figure 3) de 7 µm de diamètre dont le rôle est de transporter les gaz entre les poumons et les organes. Ils sont essentiellement constitués d'hémoglobine qui leur donne cette couleur rouge et participe à leur fonction. Leur cytosquelette élastique permet leur déformation afin qu'ils puissent se faufiler dans les

capillaires de diamètre inférieur.

Les leucocytes ou **globules blancs**, 4 à 11 milliards par litre de sang, sont des cellules nucléées (Figure 3) qui protègent le corps contre l'invasion de microorganismes ou de produits chimiques étrangers et qui enlèvent les débris provenant des cellules lésées ou mortes. On en distingue deux types : les **granulocytes**, nommés ainsi à cause de la présence de granules dans leur cytoplasme, qui sont produits au niveau de la moelle osseuse. Ce sont les **neutrophiles**, **basophiles** et **éosinophiles**. Les **agranulocytes** représentés par les **lymphocytes** et les **monocytes**.

Les thrombocytes ou **plaquettes**, 250 à 500 milliards par litre de sang, proviennent quant à elles de la fragmentation des mégacaryocytes. Ce sont des petites cellules anucléées de 2 à 5 μm . Leur membrane comprend des glycoprotéines (GP) dont principalement la GP IIb, IIIa et Ib ainsi que des récepteurs divers dont celui à la thrombine. De forme discoïdale à l'état non pathologique, elles changent de conformation en s'étalant et émettant des filopodes lorsqu'elles sont activées (Figure 3) et jouent un rôle clé dans les phénomènes de coagulation.

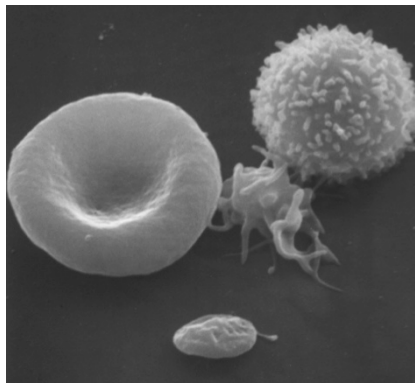


Figure 3 : Eléments figurés du sang

Photo de gauche à droite d'un globule rouge, d'une plaquette activée et d'un globule blanc et en dessous d'une plaquette non activée prise par microscopie électronique à balayage (Frederick National Cancer Institute)

Dans le sang circulent aussi des cellules et notamment les **progéniteurs endothéliaux circulants** (PEC). Il s'agit de cellules immatures provenant de la moelle osseuse et jouant un rôle actif dans la réparation vasculaire. Ces cellules peuvent être recrutées lors de lésion tissulaire ou aider à la formation de néo-vaisseaux lors d'ischémie. La preuve de l'origine médullaire et de l'implication des PEC dans les lésions endothéliales a été apportée par l'étude d'allogreffe car chez les femmes receveuses d'un donneur masculin, 5 à 35 % de cellules XY sont retrouvées au niveau de leur endothélium.⁴

1.3. La pathologie obstructive des artères coronaires ou sténose

La sténose coronaire est le résultat d'un remaniement structural du vaisseau accompagné de dépôts sur sa paroi interne nommés **plaques d'athérome** (Figure 4). Cette pathologie entre dans le cadre d'une maladie systémique, l'**athérosclérose**, qui peut atteindre tous les territoires vasculaires de l'organisme. Cette pathologie est définie par l'Organisation Mondiale de la Santé comme « une association variable de remaniement de la couche interne des artères de gros et moyen calibres. Elle consiste en une accumulation focale de graisses (les lipides), de glucides complexes (les sucres), de sang et de produits sanguins, de tissus fibreux et de dépôts calcaires. Le tout est accompagné de modification de la structure interne de l'artère. »

L'évolution des plaques est variable. Certaines vont grossir jusqu'à provoquer la sténose complète de l'artère, d'autres vont rester stables et d'autres vont rompre. Lors de la rupture, l'exposition du matériel de la plaque entraîne la formation d'un thrombus qui peut obstruer l'artère *in situ* ou se détacher et emboliser une artère distale.

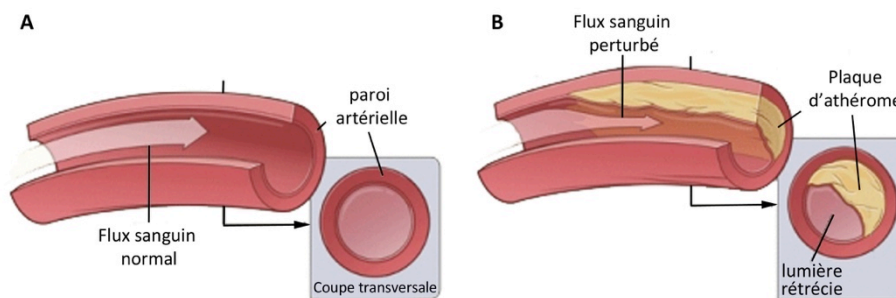


Figure 4 : Flux sanguin (d'après la NIH)

A – dans une artère saine B – dans une artère athéromateuse

2. Prise en charge clinique

Outre la prise en charge médicamenteuse visant à réduire ou limiter la formation de la plaque, des techniques chirurgicales ont été développées afin de rétablir le flux sanguin.

2.1. Le pontage

Le principe du pontage est de réaliser une dérivation de la zone sténosée afin de rétablir une circulation sanguine normale et d'irriguer à nouveau la région ischémisée (Figure 5). Pour cela, des greffons sont utilisés. Il s'agit de **greffes autologues** qui utilisent des segments de vaisseaux disponibles chez le patient comme la veine saphène, l'artère mammaire interne ou l'artère thoracique interne. Contrairement aux vaisseaux périphériques, il n'existe pas de solution prothétique pour cette localisation. Cette chirurgie est réalisée sous anesthésie générale, thoracotomie et circulation extracorporelle pour permettre l'accès direct au vaisseau à ponter et est donc très invasive.

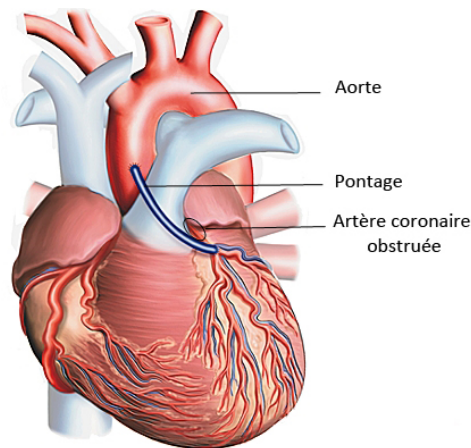


Figure 5 : Schéma d'un pontage coronarien (d'après Larousse Médical)

2.2. L'angioplastie

L'angioplastie, également appelée angioplastie coronarienne transluminale percutanée (PTCA, percutaneous transluminal coronary angioplasty), est une désobstruction mécanique de l'artère. Elle consiste en l'introduction, le plus souvent via l'artère fémorale, d'un guide jusqu'au site de la lésion. Ce **guide** sert ensuite de rail pour acheminer un **cathéter à ballonnet** au niveau de la plaque (Figure 6A). Le ballonnet est ensuite gonflé pour écraser la plaque (Figure 6B) puis l'ensemble est retiré. La circulation sanguine est alors accrue (Figure 6C). Le déroulement de l'opération est suivi **sous scopie** par rayon-X. Chaque instrument possède des repères radio-opaques afin de le situer. Le flux sanguin est contrôlé par **coronarographie**, c'est à dire via l'injection d'un produit de contraste dans le sang. Cette intervention, réalisée sous anesthésie locale, est beaucoup moins invasive qu'un pontage.

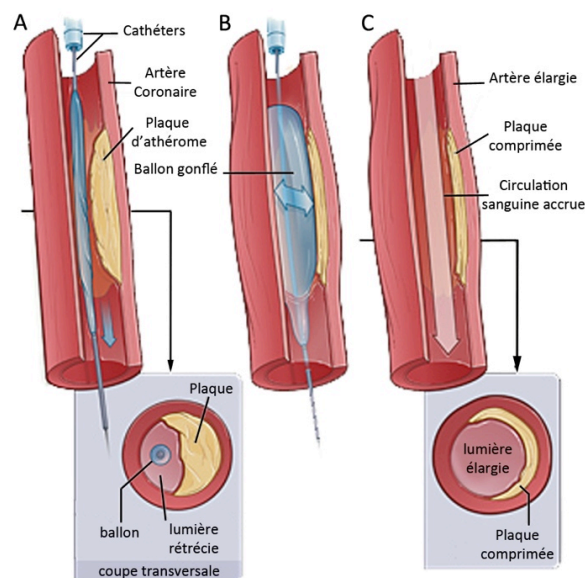


Figure 6 : Principe de l'angioplastie (d'après la NIH)

A-Acheminement du ballonnet au niveau de la plaque. B-Ecrasement de la plaque par gonflement du ballonnet. C- Rétablissement d'une circulation sanguine accrue.

La première PTCA a été réalisée par l'allemand Grüntzig en septembre 1977. Par la suite, cette intervention a été grandement pratiquée, plus de 300 000 fois aux Etats Unis en 1990, car son taux de réussite immédiat est de 50 à 90 %.⁵ Afin de diminuer l'adhésion des plaquettes et la thrombose qui résultent de l'exposition au sang du matériel de la plaque lors de sa dissection par le ballonnet, de l'aspirine et de l'héparine sont administrées au patient. Cependant après une angioplastie, une complication est très limitante : la **resténose** ou nouveau rétrécissement de la lumière, qui survient dans 30 à 60 % des cas.^{5,6} Afin de limiter l'occurrence de cette complication, une **endoprothèse métallique**, un **stent**, a été développée. Il s'agit d'une structure tubulaire grillagée qui, après écrasement de la plaque par angioplastie, est acheminée sous forme contractée, donc de diamètre réduit, jusqu'à la lésion via un cathéter puis déployée par gonflement d'un ballonnet ou grâce aux propriétés de mémoire de forme de son matériau. Le stent est placé au niveau de la plaque écrasée et maintient mécaniquement la lumière ouverte (Figure 7).

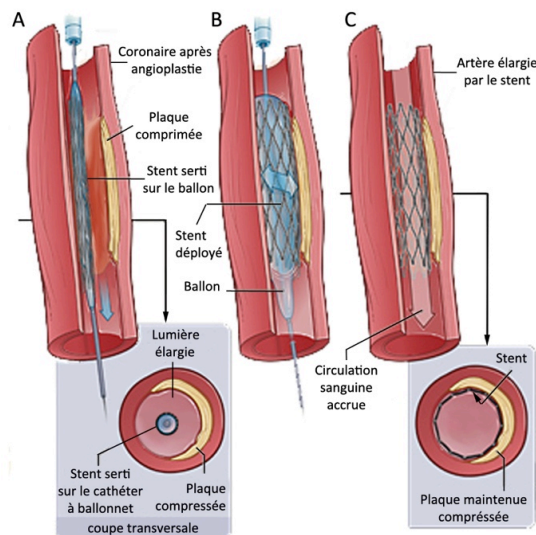


Figure 7 : Pose d'un stent après PTCA (adaptée de la NIH)

A – Le stent, ici serti sur ballonnet, est acheminé jusqu'au lieu de la plaque précédemment écrasé par le gonflement d'un ballonnet nu. B – Le stent est déployé et prend le diamètre de l'artère. C – Le cathéter et le guide sont retirés, la circulation est accrue

2.3. Les limitations de cette technique

Le développement exponentiel de cette technologie a révolutionné la cardiologie interventionnelle et a élevé la PTCA suivie d'une pose de stent parmi les interventions cliniques invasives les plus pratiquées.⁷ En effet, en 2004, le nombre de stents implantés aux Etats Unis atteignait le million.⁸ Son taux de réussite est excellent⁷ et, étant moins invasive, cette intervention peut être proposée à des personnes récusées au pontage du fait de pathologies associées.

Néanmoins malgré les évolutions technologiques qui seront détaillées dans la partie « Stent », deux complications sont décrites comme limitant le succès à long terme de ces opérations : la **resténose** et la **thrombose tardive intra-stent**.

2.3.1. La resténose intra-stent

La **resténose intra-stent** (SR, Stent restenosis) se caractérise par la formation d'**hyperplasie néo-intimale**. Il s'agit de la prolifération d'un tissu cicatriciel dans la lumière qui va engendrer la réduction du flux sanguin (Figure 8). Les contraintes mécaniques induites par la PTCA puis la pose de stent sur la paroi artérielle engendrent une activation des CML qui prolifèrent dès lors de la média vers l'intima et produisent une importante matrice extracellulaire.^{9,10}

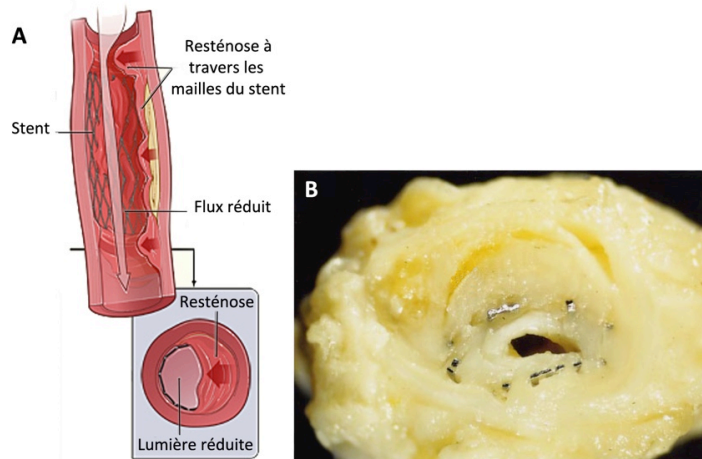


Figure 8 : Resténose intra-stent

A – Schéma (d'après la NIH) B – Photo en coupe transversale du rétrécissement artériel 21 mois après l'implantation d'un stent¹¹

2.3.2. La thrombose tardive intra-stent

La thrombose intra-stent (LST, Late Stent Thrombosis) est la formation d'un caillot, un thrombus, au niveau du stent (Figure 9). Celui-ci peut grossir et obturer l'artère ou se détacher et obturer une artère plus petite, provoquant par exemple un accident vasculaire cérébral. Cette thrombose est qualifiée de **tardive** lorsqu'elle survient entre un mois et un an après la pose du stent et très tardive par la suite.¹² Dans 45% des cas, cette complication aboutit au décès du patient.¹³ Les mécanismes impliqués sont plus ou moins bien définis et seront expliqués par la suite.

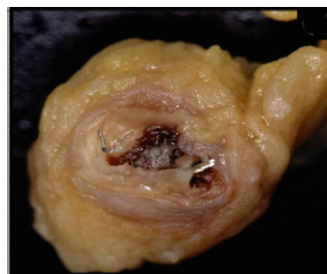


Figure 9 : Thrombose intra-stent⁷

2.3.3. Infection sur prothèse

Beaucoup plus rare, l'infection de la prothèse s'associe à des taux de morbidité et mortalité élevés et le traitement est compliqué. Les mailles métalliques des stents sont des vecteurs de bactéries tel *staphylococcus aureus*, majoritairement mis en cause.¹⁴

3. Les endoprothèses métalliques ou « Stent »

3.1. Les premiers stents

Le mot stent vient du nom d'un dentiste anglais Charles Thomas Stent (1807-1885) qui a mis au point un matériau à base de latex pour les prothèses dentaires. Ce matériau a été utilisé après la première guerre mondiale dans la reconstruction faciale des « gueules cassées » sous le nom commun de stent.¹⁵ C'est en 1966 que Weldon et al.¹⁶ définissent le mot stent comme « tout type de support non biologique utilisé pour donner une forme à un tissu biologique ». Dès 1969 l'américain Charles Theodore Dotter (1920-1985) décrit l'implantation d'un ressort hélicoïdale dans les artères fémorale et poplitée chez le chien mais des rétrécissements intra-stent importants sont observés.¹⁷ Cette spire en Nitinol, un alliage à mémoire de forme, est introduite sous forme contractée (Figure 10A). Dans cette configuration elle présente un petit diamètre et une grande longueur. La spire est déployée sous l'effet de la chaleur. Son diamètre augmente et sa longueur diminue.

C'est seulement en 1985 que le concept de stent monté sur un ballon est décrit par Palmaz *et al.* Il s'agit d'un stent en acier inoxydable de 15 mm de longueur et 1,6 mm de diamètre implanté dans la coronaire gauche chez le chien.¹⁸

Au printemps 1986, Jacques Puel (1949-2008) à Toulouse et Ulrich Sigwart (1941-) à Lausanne implantent les premiers stents intra coronariens chez l'homme.¹⁹ Ce stent en Nitinol, nommé Wallstents® (Figure 10B), est auto-déployant. Il est monté sur un cathéter et contraint à un petit diamètre par une gaine. Lors du retrait de cette dernière la super-élasticité de l'alliage permet au stent de reprendre son diamètre initial.

En parallèle Palmaz et Schatz ont continué leurs recherches et ont mis au point le Palmaz-Schatz stent (Figure 10C) qu'ils implantent dans les artères coronaires natives humaines.²⁰ Depuis des innovations n'ont cessées d'être développées visant à réduire les complications post-opératoires.

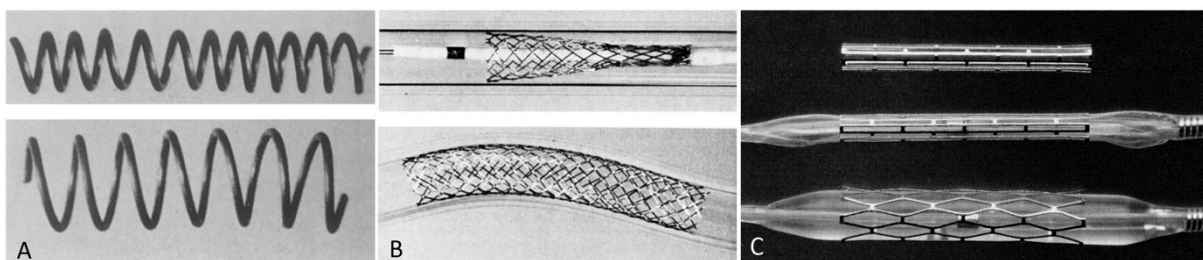


Figure 10 : Premiers stents endovasculaires.

A – Stent de Dotter compacté en haut et déployé en bas.²⁰

B – Wallstent implanté dans un tube en plastique. En cours de déploiement en haut, déployé et épousant le tube lors de mouvement en bas.⁶

C – Prototype du Palmaz-Schatz stent. De haut en bas, après fabrication, serti sur le ballon et déployé sur le ballon.²¹

3.2. Les alliages constituant la structure métallique

Pour pouvoir remplir leur rôle, les structures des stents et l'alliage qui les constitue doivent avoir certaines propriétés définies dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : Cahier des charges non exhaustif d'un matériau de stent
(adapté de Nazneen et al.)²²*

1	Une bonne élasticité pour passer dans les vaisseaux tortueux avant déploiement
2	Un taux de déformation important pour supporter le passage de la forme contractée à la forme déployée
3	La capacité d'être serti sur un cathéter ou sur un ballonnet
4	Une excellente résistance à la corrosion
5	Une bonne biocompatibilité afin de ne pas déclencher une réaction
6	Notamment une bonne hémocompatibilité car il est en contact direct avec le sang
7	Une radio-opacité pour le suivre pendant et après son implantation Ainsi qu'une compatibilité avec l'imagerie à résonance magnétique
8	Un bon rapport coût-efficacité

Afin de valider les contraintes mécaniques n°1, n°2, et n°3 du Tableau 1 et de comparer les matériaux entre eux certaines valeurs sont évaluées. L'essai de traction est un test couramment utilisé pour caractériser un matériau. Il en résulte une courbe typique de la contrainte en fonction de l'allongement qui peut être décomposée en trois phases (Figure 11). Une première partie linéaire correspond à une déformation réversible, la déformation élastique. La pente de cette partie linéaire s'appelle le module d'Young (E), plus il est élevé plus le matériau est rigide. Une fois la limite d'élasticité (R_e) atteinte, la déformation devient irréversible, c'est la phase de déformation plastique. La contrainte augmente avec l'allongement jusqu'à un maximum, la résistance à la traction (R_m), plus cette contrainte est grande plus le matériau est résistant. Enfin la contrainte décroît avec l'allongement, c'est la striction qui se termine par la rupture.

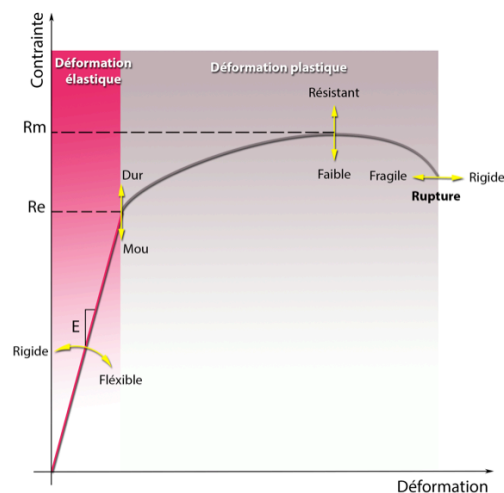


Figure 11 : Courbe de traction

On distingue deux types de stents selon leur système d'implantation, les stents auto-déployants comme le Wallstent® et les stents montés sur ballon comme le Palmaz-Schartz® stent.

Les stents auto-déployants sont constitués d'alliages métalliques ayant des propriétés particulières telle que la capacité de garder une forme en mémoire et de la reprendre après déformation, d'alterner entre deux formes en fonction de la température ou de s'allonger sans déformation plastique, c'est à dire un comportement superélastique. Ce sont les alliages à mémoire de forme (AMF). Le plus courant dans le domaine médical est le Nitinol, NiTi, composé pour moitié de nickel (Ni 50,8%) et pour moitié de titane (Ti 49,2%) qui est utilisé dans de nombreux dispositifs médicaux comme les instruments chirurgicaux, les fils de maintien d'orthodontie ou les stents.

Pour la grande majorité d'entre eux, les stents en AMF ne sont pas montés sur un ballon mais contraints sur un cathéter et maintenus sous forme contractée par une gaine que l'on rétracte pour permettre au stent de reprendre sa forme déployée (Figure 12A). Contrairement au stent de Dotter (Figure 10A) qui utilisait le changement de forme avec la température, pour les stents actuels, ce sont les propriétés superélastiques qui sont principalement utilisées.

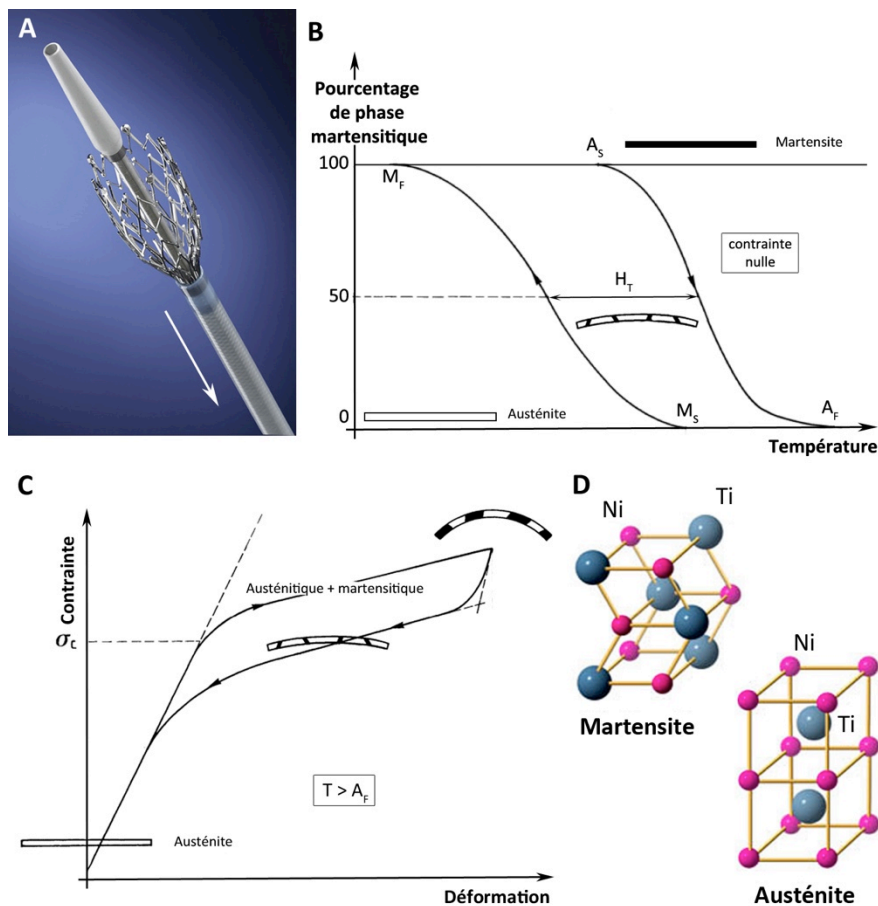


Figure 12 : Propriétés du Nitinol

A – Stent auto-déployant (Covidien)

B – Courbe de changement de phase en fonction de la température (d'après NF A51-80)²³

C – Courbe de contrainte en fonction de la déformation du Nitinol (d'après NF A51-80)²³

D – Structure cristalline du Nitinol

Cependant le terme élasticité est un peu abusif. En effet, il ne s'agit pas uniquement d'une élasticité au niveau moléculaire mais d'un changement de phase solide induit par la contrainte. Le Nitinol est composé d'un mélange de deux phases de structure cristalline différentes nommées : martensite et austénite (Figure 12D). Comme le montre la Figure 12B, la proportion de l'une et l'autre de ces phases est fonction de la température. Le changement de phase n'est pas le même selon le sens de variation de la température ainsi il existe une température au-dessus de laquelle l'alliage est 100% austénitique A_F mais il faut diminuer la température jusqu'à M_S ($A_F - M_S \neq 0$) pour voir apparaître les premières traces de martensite, de même il existe une température au-dessous de laquelle l'alliage est 100% martensitique M_F et il faut augmenter la température jusqu'à A_S ($A_S - M_F \neq 0$) pour que les premières traces d'austénite apparaissent. A 50% de martensite et donc 50% d'austénite, l'hystérésis (HT) est définie comme la différence de température entre le changement de phase lors de l'augmentation et celui lors de la diminution de la température.

La température n'est cependant pas le seul paramètre permettant de déclencher cette transformation. Ainsi pour une température supérieure à A_F , une contrainte supérieure à une contrainte seuil (σ_c), fait apparaître la martensite (Figure 12B). La phase martensitique étant plus compacte (Figure 12D), il en résulte une élasticité très importante de l'ordre de 10% pour le Nitinol.

Pour les stents montés sur ballon, il s'agit dans ce cas d'une déformation plastique. Majoritairement usinés par découpe laser, les stents sont ensuite électropolis et sertis sur un ballon puis déployés dans les artères (Figure 10C).²⁴

L'alliage le plus utilisé est l'acier inoxydable (SS, Stainless Steel) chirurgical 316L (Tableau 2). Malgré sa thrombogénicité et les possibles interférences avec l'imagerie à résonance magnétique du fait de sa teneur en fer, sa large utilisation dans le domaine chirurgical, sa résistance à la corrosion et son élasticité en font un matériau utilisé dans 67% des stents approuvés par la Food and Drug Administration (FDA).²²

En 2001 une étude portant sur l'impact de l'épaisseur des mailles des stents, *Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Strut Thickness Effect on Restenosis Outcome* (ISAR-STEREO), comparant l'implantation d'un même modèle de stent ayant deux épaisseurs de mailles différentes (50 μm ou 140 μm) et largeur constante (100 μm) a démontré un taux de resténose moindre dans le groupe ayant reçu les stents à fine maille.²⁵ De nouveaux alliages, ayant un module d'Young supérieur à celui du SS, ont donc été utilisés pour la fabrication des stents. A section égale, ils exercent une force radiale supérieure au SS et donc à force égale, la section des mailles est diminuée. Parmi eux, les alliages de cobalt-chrome (CoCr) utilisés depuis des dizaines d'années dans les domaines orthopédiques et dentaires ont alors été employés pour réaliser des stents. Notamment l'alliage CoCr L-605 (Tableau 2) qui, de par son module d'Young élevé, permet la réalisation de mailles très fines (80-90 μm vs 100-140 μm pour les stents en 316L). De plus, il est radio-opaque, non ferreux et donc n'interfère pas à l'IRM. Actuellement, environ 17% des stents autorisés par la FDA sont en CoCr.²² Cependant le

E élevé de ce matériaux, donc sa grande élasticité, entraîne plus de rétractation de stent après implantation, soit la réduction de son diamètre, ce qui accroît le risque de malposition, resténose et thrombose.²⁶

Afin de conserver des mailles fines, une bonne radio-opacité tout en limitant l'effet de rétractation un autre alliage a été utilisé, le Platine-Chrome (PtCr). Sa densité élevée (Tableau 3) permet un bon suivi par rayon-X. De plus son E inférieur à celui du CoCr limite l'effet de rétractation (Tableau 3).²⁷

Tableau 2 : Composition des alliages SS 316L et CoCr L-605

Alliage	316L	L-605	PtCr
Carbone (C)	0,030 % max	0,05-0,15 %	0,003-0,023 %
Chrome (Cr)	17,0-18,0 %	19,0-21,0 %	17,5-18,5 %
Manganèse (Mn)	2,0 % max	1,0-2,0 %	0,05 % max
Nickel (Ni)	13,0-15,50 %	9,0-11,0 %	8,5-9,5 %
Molybdène (Mo)	2,0-3,0%	-	2,43-2,83 %
Silice (Si)	0,75 % max	0,40 % max	0,10 % max
Azote (N)	0,10 % max	-	0,010 % max
Phosphore (P)	0,025 %	0,040 % max	0,010 % max
Souffre (S)	0,010 % max	0,03 % max	0,0007 % max
Tungstène (Tu)	-	14,0-16,0 %	-
Fer (Fe)	Reste	3,0 % max	37 %
Cobalt (Co)	-	Reste	-

Ces quatre matériaux constituent les alliages principaux de l'armature des stents. Le Tableau 3 ci-dessous compare leurs différentes propriétés mécaniques.

Tableau 3 : Propriétés mécaniques des principaux alliages de stent

Alliage	Module d'Young (E) (GPa)	Limite d'élasticité Re (MPa)	Résistance à la traction Rm (MPa)	Densité (g/cm ³)
316 L	190	331	586	7,9
NiTi phase austénitique	83	195-690	865	6,7
phase martensitique	28-41	70-140		
L-605	243	483	1034	9,2
PtCr	203	480	839	9,9

3.3. Géométrie et flux

Comme expliqué ci-dessus l'épaisseur des mailles a un impact sur la resténose intra-stent mais ce n'est pas le seul élément de géométrie du stent qui entre en considération. En effet, la forme des mailles du stent a également un impact sur la flexibilité de ce dernier.

Un paramètre important est la force de cisaillement sur la paroi artérielle (τ). Exprimée en N/m^2 , c'est la force tangentielle provenant du frottement du sang sur la paroi des artères. Elle est complétée par la pression artérielle (p) en N/m^2 , qui est la force radiale (Figure 13A). Lorsque qu'une artère est saine, l'écoulement est laminaire, c'est à dire que les particules évoluent de manière parallèle. Lorsque les paramètres du flux sont modifiés (viscosité, vitesse, géométrie, etc.) l'écoulement peut alors devenir turbulent en passant par une phase transitoire (Figure 13B). Les mailles du stent dans la lumière peuvent, de par leur géométrie, perturber le flux sanguin, créer des zones de

turbulences et de stagnation et donc augmenter τ en particulier si la force radiale exercée par le stent n'est pas constante sur sa longueur et dans le temps.²⁸

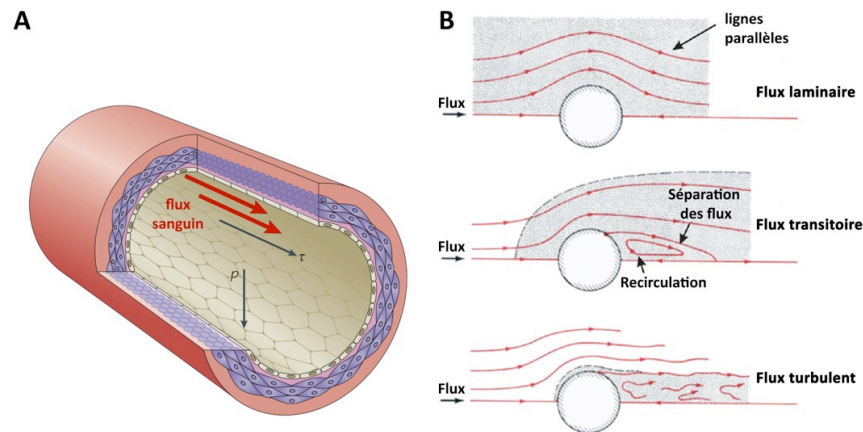


Figure 13 : Forces et flux sanguin

A – Force de cisaillement τ et pression artérielle p ²⁹ B – Flux laminaires et turbulents³⁰

Les stents, de par leur géométrie et la force qu'ils exercent sur le vaisseau peuvent donc jouer un rôle dans les phénomènes de resténose et thrombose. Afin de minimiser ces effets, différentes géométries sont étudiées, on peut les diviser en trois groupes : les spires, les maillages tubulaires et les tubes fendus. Les spires sont des fils ou des bandes enroulées pour former un tube, les maillages tubulaires sont fabriqués à partir d'un fil déformé pour créer des mailles puis un tube et les tubes fendus, dont font partie la majorité des stents actuellement disponibles, sont des tubes usinés afin de former des mailles (Figure 14A).³¹ Les mailles peuvent être ouvertes ou fermées (Figure 14B) afin de donner de la souplesse ou avoir plus de rigidité.³² Les liaisons entre les mailles peuvent également prendre des formes plus ou moins sinueuses afin de permettre le mouvement sans fragiliser le matériau. La section des mailles entre aussi en jeu et peut prendre différentes formes entre circulaire et rectangulaire.

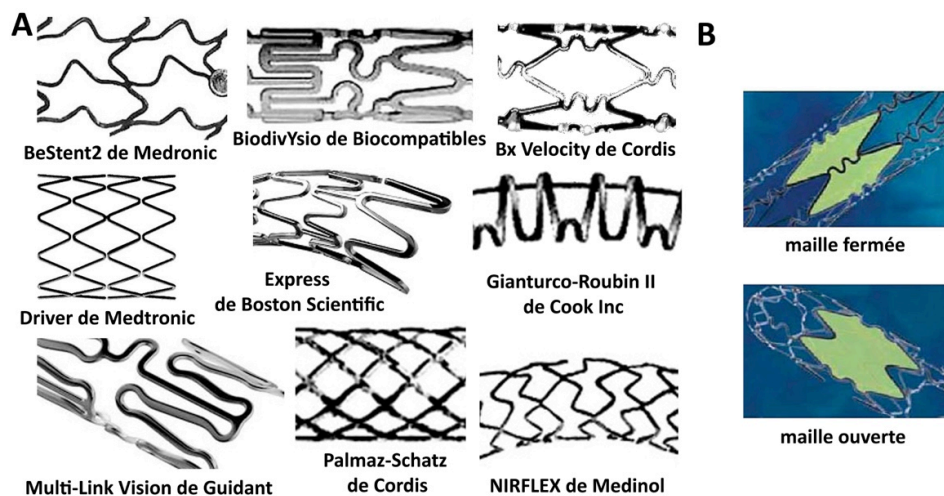


Figure 14 : Maillage des stents

A- Exemples de stents commercialisés³¹ B- Mailles ouvertes et fermées³²

3.4. Première génération de stents : les stents nus

Quel que soit l'alliage qui les constitue, ces stents sont composés de métal non recouvert d'où leur nom stents « nus » (BMS, Bare Metal Stent). L'efficacité des BMS comparés à la PTCA seule a été établie par deux études : BENESTENT⁶ incluant 520 patients belges et néerlandais et STRESS³³ incluant 410 patients américains. La complication majeure reste cependant la resténose survenant dans 20 à 30 % des implantations. L'utilisation du CoCr a permis, par la réduction de l'épaisseur des mailles, de diminuer l'occurrence de la resténose à environ 15 %.²⁵

3.5. Deuxième génération de stents

Afin de diminuer encore les taux de resténose, une deuxième génération de stents a été développée. Les BMS ont été couverts de revêtements afin d'améliorer leur intégration dans le vaisseau. Certains ont été rendus actifs via l'incorporation de molécules dans le revêtement, ce sont les stents à élution médicamenteuse (DES, Drug Eluting Stent).

3.5.1. Les revêtements inorganiques

Une première approche a été d'améliorer l'hémocompatibilité et de réduire la réaction au stent en le recouvrant d'un matériau connu pour ces propriétés. Divers revêtements ont été testés afin de réduire les taux de resténose. Parmi ceux arrivés au stade clinique, on trouve les revêtements à base de carbone. Les faces internes et externes de stents en acier inoxydable (SS) ont été enduites de **carbone adamantin** par une technique de déposition à froid induite par plasma³⁴ car ce matériau limite l'activation plaquettaire. En 2004, Airolidi *et al.*³⁵ publie une première étude clinique comparant chez 347 patients un stent recouvert de carbone adamantin et un stent en SS. Après 6 mois le taux de resténose est légèrement supérieur dans le groupe des BMS, néanmoins en 2007 Meireles *et al.*³⁶ dans une étude sur 180 patients n'observent pas cette différence (Tableau 4).

Le **carbone** est aussi utilisé sous sa forme **pyrolytique**, connue pour son hémocompatibilité, par la société Sorin qui le vaporise, à basse température, en fines couches sur des stents en SS. Une étude non comparative établie qu'après 6 mois un quart des 112 patients avait une resténose (Tableau 4).³⁷

L'**or** a également été utilisé pour la faible réaction tissulaire qu'il déclenche et sa faible thrombogénicité. Cependant une étude sur 305 patients a abouti à un taux de SR sur le stent recouvert supérieur à celui du BMS (Tableau 4).³⁸

Des revêtements en **carbure de silicium** ont aussi été évalués pour leur capacité à limiter l'activation plaquettaire et l'adhésion des leucocytes.³⁹ Ce semi-conducteur déposé en phase vapeur n'a pas montré de différence significative sur l'occurrence de la resténose avec un BMS lors d'une étude sur 497 patients (Tableau 4).⁴⁰

Malgré le fait qu'aucun d'entre eux n'ait démontré un réel impact sur le taux de resténose, ces quatre revêtements se trouvent sur des stents approuvés par la FDA.

Tableau 4 : Revêtements inertes et études cliniques (adapté de O'Brien et al.)⁴¹

Revêtement	Structure	Nom du stent évalué		Resténose angiographique à 6 mois
Carbone adamantin	SS	Diamond Flex AS stent ³⁵	vs SS BMS	31,8% vs 35,9% p=0,448
			vs SS BMS	24,8% vs 21,8% p=0,84
		Phytis™ Diamond stent ³⁶		
Carbone pyrolytique	SS	CarboSTENT™ ³⁷	vs ø	25%
Or	SS	NIRflex Royal™ stent ³⁸	vs SS BMS	33,1% vs 17,8% p=0,002
Carbure de silicium	SS	Tenax™ SiC ⁴⁰	vs SS BMS	30% vs 26,7% p=0,56

SS : Stainless steel

3.5.2. Revêtements actifs

Pour améliorer l'efficacité des revêtements inertes, des molécules actives ont été greffées ou incluses afin d'être libérées à la surface des stents. Les essais ayant été très nombreux et variés dans ce domaine, nous ne traiterons dans cette partie que de certains stents ayant franchi le stade des essais cliniques.

3.5.2.1. Molécules et cibles

Différentes cibles ont été visées : l'inflammation, l'activation plaquettaire, la thrombose ou la prolifération des cellules musculaires lisses ou CML.

L'**héparine** fait partie de la grande famille polymère, c'est un glycoaminoglycane (Figure 15A). Elle est très utilisée dans les implants vasculaires pour son effet inhibiteur sur l'adhésion des plaquettes et des leucocytes limitant la formation de thrombus. De plus, l'héparine a un effet inhibiteur sur la migration et la prolifération des CML en les bloquant en phase G1 ce qui fait d'elle une excellente molécule pour lutter contre la resténose.^{42,43}

Les limus, des immunosuppresseurs, sont très largement utilisés dans les DES. Ces molécules antiprolifératives sont des macrolides, elles ont donc des propriétés antibiotiques et interfèrent dans le cycle cellulaire (Figure 15A).

Le premier d'entre eux, le **sirolimus**, aussi connu sous le nom de rapamycine, de formule brute $C_{51}H_{79}NO_{13}$, a été isolé en 1975 d'une bactérie provenant du sol de l'île de Pâques. Déjà utilisé lors des transplantations rénales afin de limiter les rejets, il inhibe la protéine mTOR, cible de la rapamycine chez les mammifères, et bloque le passage de la phase G1 à S des CML et des lymphocytes T et B (Figure 15B).⁴⁴

Le **zotarolimus**, de formule brute $C_{52}H_{79}N_5O_{12}$, est dérivé du sirolimus et spécialement mis au point pour les DES. La modification n'affecte pas ses propriétés biologiques et il conserve le même mode d'action que le sirolimus. Il est néanmoins moins soluble dans l'eau que le sirolimus ce qui permet une diffusion plus lente et surtout plus orientée vers la paroi vasculaire que la circulation sanguine.⁴⁵

L'**everolimus**, $C_{53}H_{83}NO_{14}$, est un dérivé synthétique du sirolimus, également utilisé lors de transplantation cardiaque ou rénale, il conserve la même activité biologique. Il est cependant plus lipophile que le sirolimus ce qui facilite son passage à travers les membranes cellulaires et donc permet une meilleure diffusion dans la paroi.³²

L'**umirolimus**, $C_{55}H_{87}NO_{14}$, commercialisé sous le nom de Biolimus A9™, est un dérivé très lipophile du sirolimus bloquant de la même façon le cycle cellulaire et ayant été mis au point pour les stents.⁴⁶

Le **tacrolimus**, $C_{44}H_{69}NO_{12}$, a été isolé en 1984 d'une bactérie provenant du sol japonais et est utilisé dans de nombreuses greffes. Il agit comme inhibiteur de la calcineurine, une protéine-phosphatase stimulant des facteurs de transcription. Ainsi le tacrolimus limite l'activation et le recrutement des macrophages et des lymphocytes et la production de certains facteurs aboutissant à la prolifération des CML et à la resténose.⁴⁷

Une autre molécule antiproliférative est utilisée dans les DES, le **paclitaxel**, à l'origine utilisée lors de chimiothérapie pour les cancers du poumon, du sein ou de l'ovaire. Cette molécule, $C_{44}H_{51}NO_{14}$, a été isolée en 1962 de l'écorce de l'if européen. Elle inhibe la dépolymérisation des microtubules, fibres du cytosquelette impliquées dans la mitose. Dans les CML, cette modification des microtubules limite la division et abouti à la mort cellulaire (Figure 15B).⁴⁸

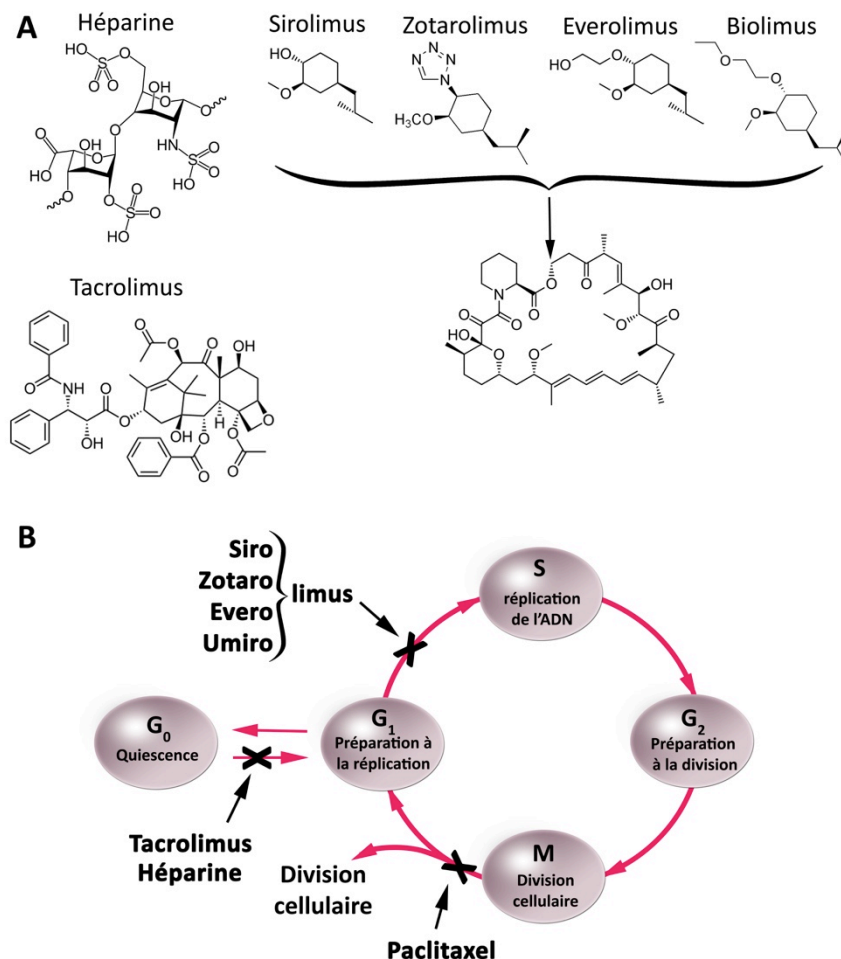


Figure 15 : Molécules éluées par les DES

A – Formule topographique B – Action sur le cycle des CML d'après Hara et al.³²

Une autre stratégie consiste à favoriser la croissance des cellules endothéliales (EC) en recrutant des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC). Pour cela certains stents ont été recouverts d'**anticorps murin monoclonal anti-humain CD34**. Ces anticorps sont spécifiques des protéines CD34+ se trouvant à la surface des PEC. L'objectif est donc de faire adhérer les PEC aux mailles du stent afin qu'ils deviennent des EC matures et favorisent la réendothélialisation de la prothèse.⁴⁹

3.5.2.2. Polymère et cinétique de libération

Deux stratégies sont envisagées pour mettre à disposition des différentes cibles la molécule active : 1) le greffage, la molécule est alors liée à la structure métallique du stent, elle est disponible en permanence et 2) l'élution, la molécule est alors diffusée dans la paroi du vaisseau ou le sang, l'action est alors transitoire. Cette deuxième stratégie est très largement utilisée pour les DES, c'est donc elle qui sera d'avantage développée. Plusieurs possibilité de libérations sont également à discerner : la molécule peut être incluse dans une matrice ou elle peut être contenue dans un réservoir et elle peut alors *in situ* être libérée par des interactions chimiques ou mécaniques.⁵⁰

Cette matrice est très souvent polymérique et doit répondre à certaines contraintes énoncées dans le Tableau 5.^{51,52}

Tableau 5 : Cahier des charges d'un revêtement de DES (d'après Parker et al.)⁵²

1	Propriétés physiques :
	<ul style="list-style-type: none"> • Ne pas coller au ballon lors de la fabrication, du stockage et de l'intervention • Ne pas craquer ou s'écailler lors des différentes déformations du dispositif, acheminement et déploiement du stent • Adhérer fermement à la structure métallique
2	Stabilité
	<ul style="list-style-type: none"> • Pendant la fabrication : revêtement, sertissage, stérilisation • Pendant le stockage • Pendant l'implantation : acheminement, déploiement • Pas d'altération chimique (ex : oxydation) • Intégrité physique • Molécule active dans le revêtement
3	Compatibilité avec le principe actif
	<ul style="list-style-type: none"> • Pas d'interaction chimique dégradant la molécule • Pas de modification physique après fabrication
4	Biocompatibilité avec les tissus vasculaire et sanguin
	<ul style="list-style-type: none"> • Hémocompatible, non thrombogénique • Non inflammatoire • Impact positif sur la cicatrisation de l'artère
5	Contrôle de la cinétique de libération

Le revêtement de la structure métallique se fait soit par trempage dans le polymère solubilisé, soit par spray de microgoutte de solution ce qui permet l'obtention de couches plus fines et très reproductives.⁵³ Des couches encore plus fines, de l'ordre de quelques micromètres, peuvent être obtenues par assemblage couche par couche soit l'adsorption successive de polymères et molécules de charges opposées.⁵⁴

Même si elle diffère selon la molécule, la cinétique de libération doit être progressive pendant au moins 30 jours pour avoir un meilleur impact sur la resténose. A l'inverse, on observe un effet « burst » lorsqu'il y a un pic de libération les premiers jours puis une quantité très faible (Figure 16).⁵²

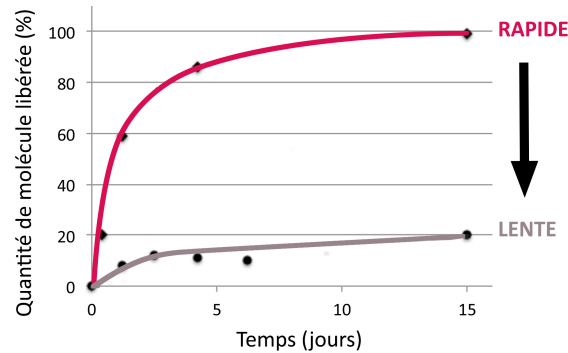


Figure 16 : Modèle de cinétique de libération⁵⁰

Différentes stratégies de revêtement ont été adoptées afin de maîtriser cette cinétique : 1) la molécule peut être incorporée au polymère et déposée à la surface du stent, 2) une couche de polymère sans molécule peut être ajoutée afin de ralentir la libération, 3) les molécules peuvent recouvrir l'intégralité du stent ou seulement la surface abluminale, 4) des cavités peuvent être usinées à la surface du stent et contenir la molécule soit incorporée dans un polymère, soit recouverte par une couche de polymère ou même sans polymère (Tableau 6).

La première génération de DES est recouverte de polymères permanents. Le CYPHER® est recouvert d'une première couche d'accroche de **Parylène C**, puis un mélange à un ratio en masse de 67 % de deux polymères, le **Poly(butyl methacrylate)** (PBMA) et le **Poly(ethylene-co-vinyl-acetate)** (PEVA), et pour 33 % de sirolimus.⁵⁵ Une troisième couche de polymère sans molécule active est ajoutée afin de ralentir la cinétique de libération (Tableau 6). Le Taxus® Express^{2™} est quant à lui recouvert d'une unique couche de copolymère le **Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)** (SIBS) et le paclitaxel (8,8 % en masse)⁵⁶ (Tableau 6). Le SIBS est choisi pour ses bonnes propriétés mécaniques – bonne adhérence au métal, élasticité adaptée – et sa compatibilité avec le paclitaxel.⁵² Ces stents ont, comme escompté, diminué le taux de resténose mais concomitamment le taux de thrombose tardive intra-stent (LST) a augmenté (cf. 3.5.2.3.). Les revêtements polymériques ont été incriminés comme facteur favorisant la LST.⁵⁷ En effet ces matériaux étaient déjà utilisés pour des dispositifs en contact avec le sang de par leur bonne adhérence avec le métal et leur hydrophobicité mais leur hémocompatibilité n'était pas suffisamment établie.⁴⁸

Une deuxième génération de DES a donc été développée, les molécules actives ainsi que les matériaux des structures ayant été optimisés et les polymères ont été choisis ou développés pour une meilleure biocompatibilité.

Ainsi, le XIENCE V™ et le Promus Element™ Plus sont recouverts d'une couche d'accroche en PBMA d'environ 1 µm puis d'une couche d'environ 8 µm d'un copolymère de **Poly(vinylidène fluoride-co-hexafluoropropylène)** (PVDF-HFP) et d'everolimus (17 % en masse)^{58,59} (Tableau 6).

Afin de rendre les stents plus furtifs, un analogue de la **phosphorylcholine** (PC), un phospholipide de la membrane cellulaire des globules rouges, a été utilisée comme plateforme de libération, comme pour le zotarolimus sur l'Endeavor®⁴¹. Un copolymère, le PC-based, de 4 monomères constitué en masse de 25 % de méthacrylate phosphorylcholine, 45 % de lauryl méthacrylate, 25 % de hydroxypropyle méthacrylate et 5 % de trimethylsilyl méthacrylate recouvre le stent. Trois couches en PC-based sont réalisées, une première d'environ 1 µm servant d'accroche, une seconde d'environ 4 µm contenant du zotarolimus (90 % en masse) et une dernière d'environ 0,1 µm (Tableau 6). Ce revêtement entraîne une libération rapide car il est hydrophile.⁵²

Un autre revêtement a donc été mis au point avec Endeavor Resolute®. Celui ci se compose de 3 polymères dont 2 mis au point spécialement pour cette application : un polymère hydrophobe, le C10 ou **Poly(butylmethacrylate-co-vinylacetate)**, dans lequel le zotarolimus est plus soluble et un polymère hydrophile, le C19 ou **poly(hexyl methacrylate-co-vinyl pyrrolidone-co-vinyl acetate)**, ayant une bonne biocompatibilité, le troisième étant le **poly(vinyl pyrrolidone)** (PVP). Une couche de **Parylène C** sert d'accroche sur la structure en CoCr puis une couche du mélange des 3 polymères C10/C19/PVP (27/63/10 en masse) et du zotarolimus (35 % en masse) (Tableau 6). Ce revêtement permet de diminuer la cinétique de libération du principe actif et améliore la biocompatibilité ainsi que la durabilité.⁶⁰

Le Bx Velocity™ Hepacoat™ quant à lui ne propose pas une libération de la molécule active mais une mise à disposition par greffage. La structure métallique est recouverte de **polyéthylèneimine** et **dextrane sulfate** sur lequel l'héparine est greffée de manière covalente (Tableau 6).⁶¹

Une troisième génération de stents s'est développée, en partie en parallèle de la deuxième, celle-ci se base sur des revêtements dégradables. Le concept est d'utiliser le revêtement comme plateforme de distribution de molécules actives puis, une fois la phase de prolifération néo-intimale évitée, le revêtement laisse place à un stent nu ce qui évite les soucis de polymères à long terme. Cette génération utilise principalement trois polymère dégradables : le **poly-L-lactide** (PLLA), le **polyglycolide** (PGL) et un copolymère de ces deux derniers le **poly-D-L-actide-co-glycolide** (PLGA)⁴¹ (Tableau 6).

Le Biomatrix™ est recouvert sur sa face abluminale uniquement par un mélange de PLA et d'umirolium qui permet une libération relativement lente (45 % en 30 jours)⁶² (Tableau 6).

A l'inverse, l'Infinium® propose une libération rapide (50 % en 7 jours).⁶² L'intégralité du stent est recouverte d'un mélange de PLLA, PLGA, PVP et paclitaxel puis d'une fine couche de PVP seul se dégradant dans les deux premières heures afin de protéger la molécule lors de l'implantation (Tableau 6).⁶³

Le Sparrow™ a une structure en Nitinol et un dispositif d'implantation qui utilise le principe d'électrolyse pour son déploiement.⁶⁴ Ce système ainsi que ses propriétés autodéployantes qui évitent le montage sur ballon, font que le stent et son cathéter ont un petit diamètre (0,014 inch soit 355,6 µm).^{65,66} Ce stent est donc particulièrement adapté aux petits vaisseaux. Il est recouvert d'un mélange de PLGA, PLLA et sirolimus (Tableau 6).⁶⁷

La structure CoCr du NEVO™ est usinée de nombreux réservoirs, ces cavités transperçant la structure métallique de la surface abluminale à la surface luminale, sont comblées par un mélange PLGA et sirolimus (Figure 17). Ce type de structure présente l'avantage de réduire de plus de 75 % la surface de contact entre le polymère et la paroi artérielle⁶⁴ et la molécule ainsi protégée est libérée lentement (80 % en 30 jours)⁶² (Tableau 6).

Afin de limiter cette surface de contact tout en conservant l'intégrité de la structure du stent, le JACTAX est recouvert de manière discontinue. Des microgouttelettes de **D-lactic polylactide** (DLPLA) et paclitaxel sont déposées sur la surface abluminale des stents (Figure 17, Tableau 6).

Le COMBO™ propose une solution hybride. Sa face abluminale est recouverte d'un mélange de PLGA, de **polylactide-co-caprolactone** (PLCL), de **polyéthylène glycol** (PEG) et sirolimus tandis que le reste du stent est recouvert d'anticorps anti CD34 afin de favoriser la réendothélialisation (Tableau 6).

Afin de s'affranchir complètement des problèmes de polymère, des stents éluant des molécules actives sans polymère ont été développés.

Sur le Janus® CarboStent™ des cavités non débouchantes sont usinées sur la surface abluminale afin de créer des réservoirs pour le Tacrolimus (Figure 17, Tableau 6). Le reste de la surface du stent est recouvert de carbone pyrolytique afin d'améliorer la biocompatibilité et de réduire la thrombogénicité du stent. Les puits n'étant pas recouverts, on observe un effet « burst » cependant la quantité de molécules éluee par la suite est suffisante car le choix d'une telle solution permet de mieux orienter la molécule vers les cellules de la paroi artérielle et d'augmenter significativement la quantité de principe actif sur le stent.⁴⁷

Le Biofreedom™ a une structure en acier 316L qui, après un traitement de surface, a une face abluminale microporeuse (Figure 17, Tableau 6). Ces pores permettent de charger le stent d'une quantité significative d'umirolium, cependant la libération est rapide (90 % en 50h).

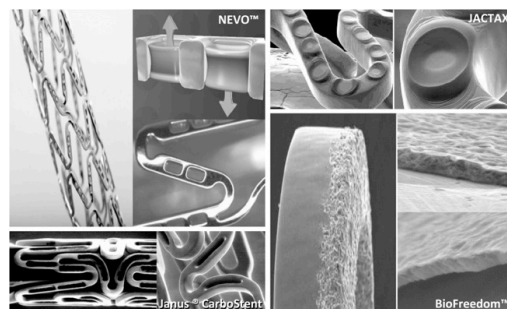
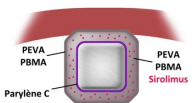

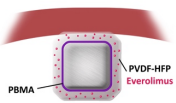
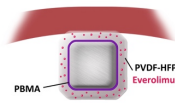
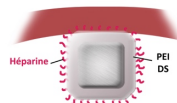
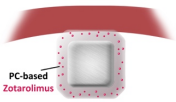
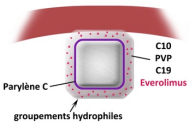
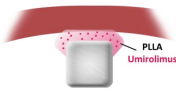
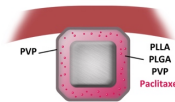


Figure 17 : Stratégies originales de DES^{66,68}

Tableau 6 : Exemple de DES

	1 ^{ère} génération DES		2 ^{ème} génération DES		
Stent	CYPHER®	Taxus® Express2™	Xience™ V	Promus Element™ Plus	Velocity™ Hepacoat™
Fabricant	Johnson & Johnson	Boston Scientific	Abbott Vascular	Boston Scientific	Johnson & Johnson
Matériau de la structure	SS	SS	CoCr	PtCr	SS
Matériau du revêtement	Parylene C PEVA et PBMA	SIBS	PBMA PVDF-HFP	PBMA PVDF-HFP	PEI DexS
Principe actif	Sirolimus	Paclitaxel	Everolimus	Everolimus	Héparine
Stratégie					
Cinétique de libération	80% en 30 jours	« Burst » sur 48h puis libération lente 15 jours	100% en 120 jours	100% en 120 jours	greffage
Statut actuel	FDA / CE	FDA / CE	FDA / CE	FDA / CE	FDA / CE
Références	7,41,47,53,55	7,56,62,69	7,52,58	26,59	61

	2 ^{ème} génération DES		3 ^{ème} génération DES		
Stent	Endeavor®	Endeavor® Resolute	BioMatrix™	Infinium®	Sparrow™
Fabricant	Medtronic	Medtronic	Biosensors international	Sahajanand Medical	CardioMind Inc.
Matériau de la structure	CoCr	CoCr	SS	SS	NiTi
Matériau du revêtement	PC-based	Parylene C C10 PVP C19	PLLA	PLLA PVP PLGA	PLGA PLLA
Principe actif	Zotarolimus	Zotarolimus	Umirolimus	Paclitaxel	Sirolimus
Stratégie					-
Cinétique de libération	95 % en 15 jours	85% en 60 jours	45% en 30 jours 100% en 6-9 mois	50 % en 9-11 jours	-
Statut actuel	FDA / CE	FDA / CE	CE	CE	En cours
Références	7	52,68	41,62,70	62,70	41,64

SS : Stainless Steel

PEVA : Poly(ethylene-co-vinyl-acetate)

PVP : polyvinyl pyrrolidinone

PLGA : poly-d,l-lactide-co-glycolide

C10 : Poly(butylmethacrylate-co-vinylacetate)

SIBS : Poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)

PVDF-HFP : Polyvinylidene fluoride co hexafluoropropylene

PBMA : Poly(n-butyl methacrylate)

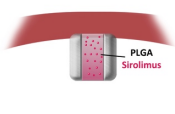
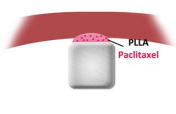
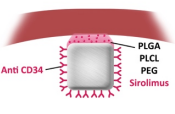
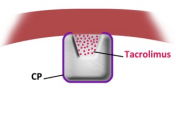
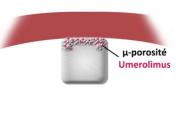
PC : Phosphorylcholine

C19 : Poly(hexyl methacrylate-co-vinyl pyrrolidine-co-vinyl acetate)

DexS : Dextran Sulfate

PEI : Polyethyleneimine

PLLA : Poly-l-lactic

	3 ^{ème} génération DES			Sans Polymère	
Stent	NEVO	JACTAX	COMBO™	Janus® Carbostent™	Biofreedom™
Fabricant	Johnson & Johnson	Boston Scientific	OrbusNeich	Sorin	Biosensors international
Matériau de la structure	CoCr	SS	SS	SS	SS
Matériau du revêtement	PLGA	Microgouttes DLPLA	PLGA PLCL PEG	Abluminale sans polymère CPyr	Sans polymère Surface microporeuse
Principe actif	Sirolimus	Paclitaxel	Sirolimus + Anti CD34	Tacrolimus	Umirolimus
Stratégie					
Cinétique de libération	80% en 30 jours 100 % en 90 jours	100% en 60 jours	100% en 90 jours	50% en 30 jours	90% en 50h
Statut actuel	En cours d'évaluation	En cours d'évaluation	CE	En cours d'évaluation	CE
Références	62,70	64	62,64	47	64,70

SS : Stainless Steel

PLCL : Polylactide-co-caprolactone

PLGA : Polylactide-co-glycolide

PEG : Polyethylene glycol

DLPLA : D-lactide poly lactide

CPyr : Carbone pyrolytique

3.5.2.3. Résultats cliniques

Le Cypher a été le premier DES implanté chez l'homme, ce premier essai a eu lieu à Sao Paulo en décembre 1999.⁷ De nombreuses études cliniques ont fait suite afin de déterminer l'effet sur la resténose, la thrombose ou les effets secondaires cardiaques majeurs (MACE) que sont la mort, l'infarctus du myocarde ou la revascularisation du vaisseau (Tableau 7).

Si l'impact sur la resténose est dans la majorité des cas indéniable, d'autres études montrent qu'une autre complication augmente, la thrombose tardive intra-stent, survenant dans 0,2 % à 1,8 % des cas.^{13,71-75}

Suite à son évaluation *in vivo* et clinique, l'héparine a été laissée en suspend car bien que présente à la surface elle ne semble pas active.

Tableau 7 : Etudes cliniques sur les DES

Nom de l'étude clinique et références	Types de stents (Nombre de patients)	Temps de suivi (mois)	Taux de resténose intra-stent (%)	MACE (%)	Taux de thrombose tardive* (%)	Résultats **
RAVEL ^{7,76}	SES Cypher (120)	12	0,0 vs 26,6	5,8 vs 28,8	0,0 vs 1,7	Sup
	vs BMS SS (118)	60	-	25,8 vs 35,2	1,7 vs 2,5	
SIRIUS ^{7,77}	SES Cypher (533)	12	3,2 vs 35,4	8,3 vs 23,2	0,0 vs 1,7	Sup
	vs BMS SS (525)	60	-	20,3 vs 33,5	1,7 vs 2,5	
TAXUS I ^{7,78}	PES Taxus (31) vs BMS SS (30)	12	0,0 vs 10,4	3,3 vs 10,0	0,0 vs 0,0	Non-inf
TAXUS VI ^{7,79}	PES Taxus (219)	9	9,1 vs 32,9	16,4 vs 22,5	0,5 vs 0,9	Non-inf
	vs BMS SS (227)	60	-	31,3 vs 27,8	0,9 vs 0,9	

Nom de l'étude clinique et références	Types de stents (Nombre de patients)	Temps de suivi (mois)	Taux de resténose intra-stent (%)	MACE (%)	Taux de thrombose tardive* (%)	Résultats **
SPIRIT FIRST ^{7,80}	EES Xience V (27)	6	0,0 vs 25,9	7,7 vs 21,4	0,0 vs 0,0	Sup
	vs BMS CoCr (29)	60	-	16,7 vs 28	0,0 vs 0,0	
SPIRIT IV ^{7,81}	EES Xience V (2 458) vs PES Taxus (1 229)	12	-	4,2 vs 6,9	0,3 vs 1,1	Sup
PLATINIUM ⁸²	PtCr EES Promus Element (768) vs CoCr EES (762)	12	-	4,9 vs 5,0	0,4 vs 0,4	Non-Inf
Lev <i>et al.</i> ⁸³	Bx Velocity Hepacoat (124)	1	-	5,6 vs 12,3	-	Non-inf
	vs BMS SS (114)	6	-	16,1 vs 21,1	0,6 vs 6,1	
ENDEAVOR II ^{7,84,85}	ZES (598) Endeavor	9	9,4 vs 33,5	7,4 vs 14,4	0,5 vs 1,2	Sup
	vs BMS CoCr (599)	60	-	17,5 vs 28,7	0,9 vs 1,7	
ENDEAVOR IV ^{7,86}	ZES (773) Endeavor	12	13,3 vs 6,7	7,2 vs 7,0	0,9 vs 0,1	Sup
	vs PES Taxus (775)	36	-	12,7 vs 15,4	1,1 vs 1,6	
RESOLUTE ^{87,88}	ZES Endeavor Resolute (1 140)	12	4,2 vs 3,8	8,7 vs 9,7	0,4 vs 0,2	Non-Inf
	vs EES Xience V (1 152)	48	-	18,7 vs 18,9	1,3 vs 1,1	
LEADERS ⁸⁹	UES Biomatrix (857)	9	5,5 vs 8,7	9,2 vs 10,5	0,5 vs 0,5	Non-Inf
	vs SES Cypher (850)	48	-	18,7 vs 22,6	1,3 vs 2,8	
SIMPLE II ⁹⁰	PES Infinium (103)	9	7,3	9,7	1,0	-
PAINT ^{91,92}	PES Infinium (111)	9	8,3 vs 4,0	10,9 vs 8,6 vs	1,9 vs 1,9	DES vs BMS :
	vs SES (106)		vs 25,5	21,1	vs 0,0	Sup
	vs BMS SS (57)	36	-	16,6 vs 12,5 vs 33,3	1,9 vs 2,9 vs 0,0	PES vs SES : Non-inf
CARE II ^{67,93}	SES Sparrow (31) vs BMS	8	6,7 vs 45,2	6,25 vs 8,6 vs	-	SES vs BMS :
	NiTi (22) vs BMS CoCr (21)		vs 44,0	16,7		Non-inf
NEVO RES I ^{94,95}	SES NEVO (202)	6	2,9 vs 9,4	4,0 vs 7,4	0,0 vs 1,1	Sup
	vs PES Taxus (192)	24	-	7,2 vs 13,0	-	
FHU JACTAX HD ⁹⁶	PES JACTAX HD (103)	9	5,2	13,6	0,0	-
OCTDESI ⁹⁷	PES JACTAX HD† (20) vs PES	6	0,0 vs 4,8	5,0 vs 9,5	-	HD vs Taxus‡
	JACTAX LD (21) vs PES Taxus (19)		vs 5,3	vs 5,2		Inf
REMEDEE ⁹⁸	SES Combo (124) vs PES Taxus (59)	9	8,3 vs 13,5	8,9 vs 10,2	0,0 vs 0,0	Non-inf
JUPITER II ⁹⁹	TES Janus (166) vs CCS (166)	6	11,8 vs	13,0 vs 17,2	0,0 vs 0,0	Non-inf
		12	17,3	16,1 vs 19,5		
BioFreedom FIM ¹⁰⁰	UES BioFreedom SD†† (60)	12	-	5,1 vs 11,5	0,0 vs 0,0	Non-inf
	vs UES BioFreedom LD (62)			vs 5,0	vs 0,0	
	vs PES Taxus (60)	24	-	6,8 vs 14,7 vs 10	0,0 vs 0,0 vs 0,0	

MACE : Major Adverse Cardiovascular Events (mort, Infarctus du myocarde, revascularisation du vaisseau) lorsque l'étude ne donnait pas explicitement cet index, la somme des 3 a été faite.

* Thromboses probables ou définies survenu après 30 jours

** Conclusions de l'étude vis à vis du MACE. **Sup** : supérieur. **Non-inf** : Non inférieur

† Cette étude compare deux stents JACTAX contenant une quantité de principe actif différent. : JACTAX HD (high dose) et JACTAX LD (low dose) contenant respectivement 0,575 µg/mm et 0,313 µg/mm de polymère et paclitaxel

†† Cette étude compare deux stents BioFreedom contenant une quantité de principe actif différent. : BioFreedom SD (standard dose) et BioFreedom LD (low dose) contenant respectivement 15,6 µg/mm et 7,8 µg/mm de polymère et paclitaxel pour un stent de 16 mm

‡ Comparaison du recouvrement des mailles par tomographie par cohérence optique (OCT)

SES : Sirolimus Eluting Stent

SS : Stainless Steel

EES : Everolimus Eluting stent

UES : Umirolimus Eluting Stent

BMS : Bare Metal Stent

PES : Paclitaxel Eluting Stent

ZES : Zotarolimus Eluting Stent

CCS : Carbone pyrolytic Coating Stent

Les mécanismes qui aboutissent à cette formation de thrombus sont mal définis. Les raisons évoquées sont : 1) un arrêt prématuré du double traitement antiagrégant plaquettaire,^{74,101} 2) un retard de réendothélialisation du stent laissant les mailles exposées au sang ou un dysfonctionnement des cellules endothéliales,^{62,102-104} 3) une réaction au polymère de revêtement⁵⁷ et 4) un défaut de position du stent laissant des mailles non plaquées contre la paroi vasculaire et donc exposées au flux sanguin.¹⁰⁵

Le retard d'endothélialisation sur les différents DES et leurs impacts sur la thrombomoduline, une glycoprotéine membranaire de la cellule endothéliale sur laquelle se fixe la thrombine la rendant anticoagulante, ont été évalués chez le lapin par Joner *et al.*¹⁰⁶ A 14 jours, la différence d'endothélialisation des mailles des DES et BMS est significative (Figure 18). Cette différence s'estompe à 28 jours mais l'immunomarquage de la thrombomoduline montre sa faible expression sur les stents comparée aux artères contrôles saines.

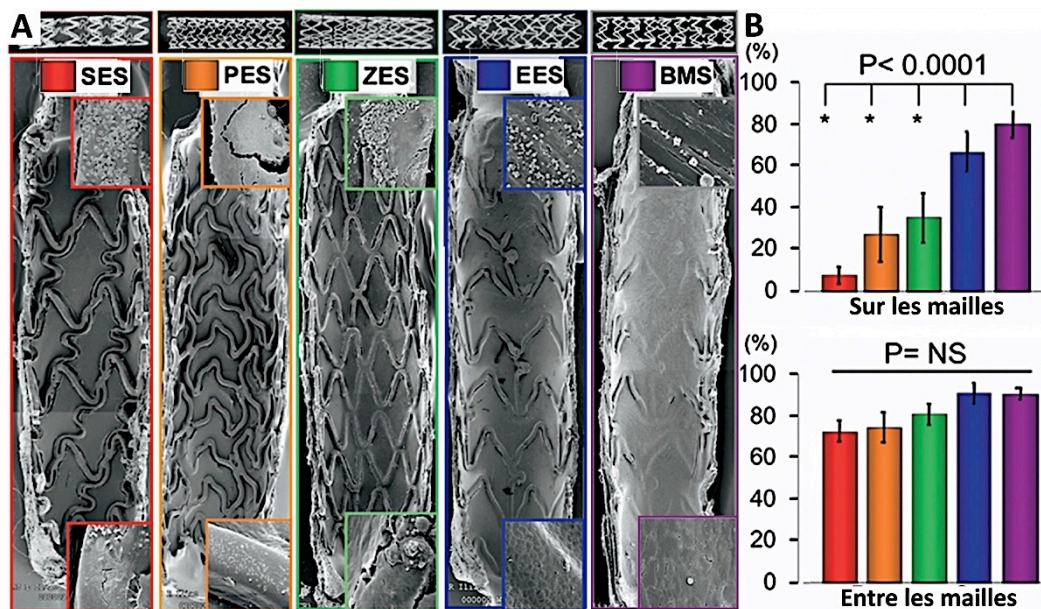


Figure 18 : Recouvrement des DES et BMS 14 jours après implantation¹⁰⁶

A – Images MEB de chaque stent. Encadrés représentatifs grossissement x200

B – Quantification du recouvrement endothélial via les analyses morphométriques

Néanmoins, le retard de réendothélialisation n'est qu'une conséquence menant à la thrombose et il faut en rechercher la cause. Les polymères durables sont incriminés de par leur biocompatibilité insuffisante et la qualité du revêtement. Sur un cas de thrombose tardive à 18 mois, l'autopsie a révélé la présence de fibrine et de cellules inflammatoires au niveau d'un DES, une probable hypersensibilité au polymère du DES a été mise en cause.⁵⁷

D'autre part, une observation au MEB des revêtements permanents de différent DES de 1^{ère} et 2^{ème} génération avant ou après implantation échouée révèle des défauts de fabrication et un endommagement lors de la pose (Figure 19).^{107,108} On observe le délaminage des polymères, des fissures qui accroissent la surface métallique exposée lors du déploiement, ou des ponts entre les mailles. L'étude post-implantation a

cependant des limitations non négligeables, il s'agit d'un petit nombre de patients, de lésions tortueuses et calcifiées pour la plupart et de stents ayant subi plus de manipulation que la normale.¹⁰⁸

Actuellement, des études similaires sur les DES de 3^{ème} génération ayant un revêtement dégradable ou ceux sans polymère n'ont pas été décrites. Toutefois, les résultats des études cliniques ne démontrent que rarement leur supériorité sur les générations précédentes.

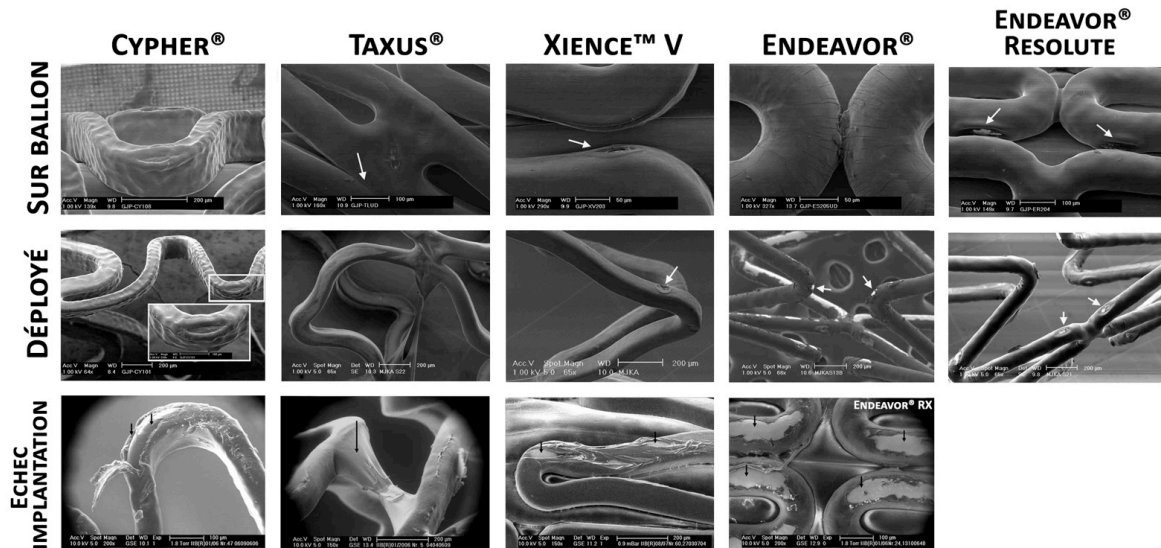


Figure 19 : Images MEB de différents revêtements de stent^{107,108}

Serruys et Daemen défendent l'hypothèse que la thrombose tardive n'est pas liée au DES mais aux stents, DES et BMS.¹⁰⁵ Ils reconnaissent l'augmentation de la LST sur les DES mais l'expliquent notamment par une mauvaise implantation (Figure 20). En effet, une étude basée sur les échographies intravasculaires de 3 études cliniques comparant 180 SES vs 145 BMS a montré un déploiement incomplet du stent dans respectivement 25 % vs 8,3 % des cas sans pour autant pouvoir faire un lien avec une conséquence clinique.¹⁰⁹ Le lien entre la malposition du stent et la LST a été par la suite établie via une méta-analyse¹¹⁰ ou comparaison d'échographies intravasculaires et d'analyses histologiques.¹¹¹

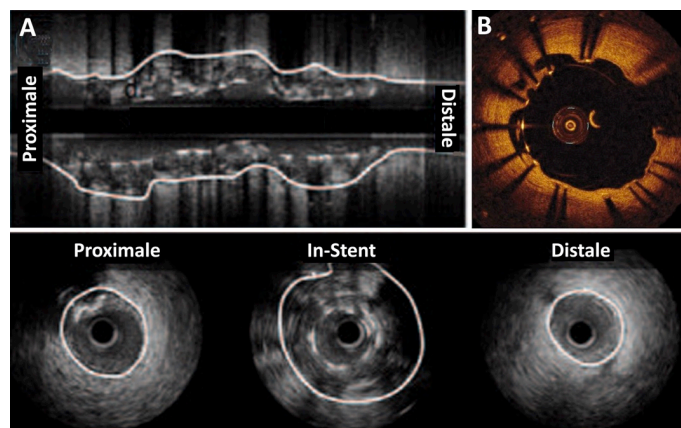


Figure 20 : Malposition de stent

A - Echographies intravasculaires¹¹¹ B - Tomographie en cohérence optique¹¹²

3.6. Stents et recherches actuelles

Depuis les années 1980, en parallèle des endoprothèses métalliques, émerge un concept de structures transitoires présentes pour « faire le travail puis disparaître »,¹¹³ ainsi ont été développés des stents entièrement biodégradables (BDS). Avec la résorption de l'implant, les problèmes de recouvrement des mailles et de thrombose sont probablement réduits ainsi que le temps du double traitement anti-plaquettaire, ce qui limite les complications de saignement.¹¹⁴ L'absence de structure métallique présente plusieurs avantages, elle limite les perturbations de flux sanguin, facilite la récupération des propriétés vasomotrices du vaisseau et son remodelage expansif.⁶⁶ A long terme, ils n'entraînent aucune interférence et permettent l'implantation d'un nouveau stent en cas de récurrence car il ne reste pas de trace du stent initial. Les BDS doivent néanmoins répondre au même cahier des charges que les stents « classiques ». Les trois difficultés majeures sont l'absence de radio-opacité et les faibles force radiale et capacité à se déformer des matériaux utilisés. Comme l'atteste le Tableau 8, les propriétés mécaniques des principaux matériaux utilisés dans la conception de BDS sont relativement éloignées de celles du matériau de référence qu'est l'acier inoxydable 316L. Pour fournir une même force radiale, les BDS ont donc des mailles plus épaisses. De plus les propriétés mécaniques évoluent au cours de la dégradation, la force radiale diminuant. Celle-ci doit cependant être suffisante durant la période de remodelage afin de suppléer l'artère tant que ses propriétés mécaniques propres ne sont pas suffisantes (Figure 21), mettre au point de tels stents est donc un réel défi.

Tableau 8 : Propriétés mécaniques de différents matériaux de BDS (d'après Onuma et al.)¹¹⁴

Matériaux	Module d'Young (E) (GPa)	Résistance à la traction Rm (MPa)	Allongement à la rupture (%)	Temps de dégradation (mois)
316 L	193	668	40	Biostable
PLLA	3,1-3,7	60-70	2-6	>24
PDLA	3,1-3,7	45-55	2-6	12-6
PGL	6,5-7,0	90-110	1-2	6-12
50/50 PLLA/PGL	3,4-3,8	40-50	1-4	1-2
82/18 PLLA/PGL	3,3-3,5	60-70	2-6	12-18
Alliage Mg	40-45	220-330	2-20	1-3

PLLA : Poly-L-lactic acid / PDLA : Poly-D-L-lactic acid / PGL : Poly(glycolide) / Mg : Magnesium

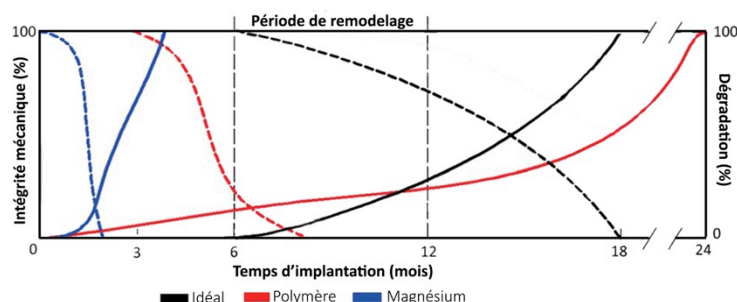


Figure 21 : Balance dégradation/Intégrité mécanique (adapté de Sun et al.)⁶²

Le premier BDS ayant obtenu le marquage CE est le **Igaki-Tamai** (Tableau 9), il s'agit d'un stent auto-déployant monté sur ballon, qui peut être radio-suivi grâce aux 2 marqueurs en or à ses extrémités et qui se déploie en deux temps, une première phase consiste à chauffer via le ballonnet jusqu'à 70°C puis dans les 20-30 min suivante la température corporelle de 37°C achève le déploiement.¹¹⁴ L'**acide poly-L-lactique (PLLA)** est le matériau le plus utilisé dans la fabrication des BDS. Il est métabolisé via le cycle de Krebs en particules de carbone et eau qui sont ensuite phagocytées par les macrophages. Une première étude clinique chez l'homme (FIM, First In Man) sur 15 patients et 25 stents n'a montré aucune thrombose ni effets secondaires cardiaques majeurs (MACE) à 30 jours. A 6 mois hyperplasie néointimale était comparable à celle des BMS. Une autre étude sur 50 patients et 84 stents a permis un suivi à 3 et 10 ans. Cette étude a confirmé la dégradation des stents et l'absence de mailles dès 3 ans avec une sténose moyenne de 25 %.¹¹⁴ De nouvelles angioplasties de la lésion traitée (TLR, Target Lesion Revascularisation) ont été réalisées dans 16 %, 18 % et 28 % des cas à respectivement 1 an, 5 ans et 10 ans.¹¹⁵

Le **BVS** (Bioresorbable Vascular Scaffold) combine BDS et DES car il est dégradé et libère de l'everolimus (Tableau 9). Conçu pour l'implantation coronarienne, deux marqueurs en platine permettent son suivi radiologique. Afin de ne pas dégrader ses propriétés, ce stent doit être stocké à -20°C pas plus de 8 semaines ce qui complique son utilisation. La preuve de concept et de l'innocuité du BVS 1.0 ont été montrées dans une première étude clinique ABSORB Cohort A, 3,3 % de MACE à 1 an puis pas d'évolution à 5 ans.¹¹⁶ Cependant des échographies intravasculaires (IVUS, Intravascular Ultrasound) à 6 mois et 2 ans ont mis en avant une réduction de la lumière (initialement $6,04 \pm 1,12 \text{ mm}^2$, 6 mois $5,19 \pm 1,33 \text{ mm}^2$, 2 ans $5,47 \pm 2,11 \text{ mm}^2$) qui a été attribuée en partie à une rétraction du stent, la structure a donc été redessinée afin d'augmenter la force radiale. Une nouvelle étude clinique ABSORB Cohort B, évaluant le BVS 1.1 chez 101 patients a montré la résolution du problème avec 9% de MACE à 2 ans et pas de changement de la taille de la lumière entre 6 mois et 2 ans confirmé par IVUS.¹¹⁶

Afin d'éviter les problèmes de rétraction, le **REVA** a un design innovant constitué de 3 parties qui glissent les unes contre les autres lors du déploiement puis se bloque grâce à un système de crémaillères (Tableau 9).¹¹⁷ Sa structure en **poly(Desaminotyrosyl-tyrosine ethyl ester carbonate) iodé** (poly(DTE carbonate) iodé) présente une radio-opalescence propre. Le poly(DTE carbonate) iodé a quant à lui une décomposition en trois étapes, son hydrolyse produit un ester éthylique iodé de desaminotyrosyl-tyrosine (I_2DTE) et du dioxyde de carbone. Une seconde hydrolyse de l' I_2DTE produit du desaminotyrosyl-tyrosine iodé (I_2DT) et de l'éthanol, le clivage de I_2DT résulte en de la tyrosine et du desaminotyrosyl qui est métabolisé via le cycle de Krebs. RESORB, une première étude clinique sur le REVA chez 25 patients a donné suite à un taux de TLR supérieur à celui attendu¹¹⁷ attribué aux propriétés mécaniques insuffisantes de la structure. Une nouvelle géométrie **ReZolve™** a donc été mise au point


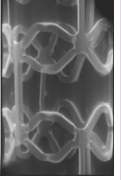
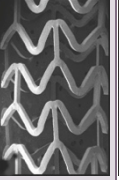
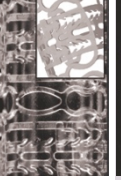
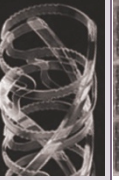




pour pallier à ce problème. Le système de blocage à crémaillère est toujours présent mais orienté de façon hélicoïdale et du sirolimus a été incorporé. Deux nouvelles études cliniques sont en cours, RESTORE sur 50 patients et une étude visant à obtenir le marquage CE.

L'**Ideal BioStent** tient son originalité de son matériau, une structure en **poly-anhydride ester** (PAE) recouverte d'un mélange de **acide salicylique** (SA), d'**acide adipique** (AA) et de sirolimus. Le SA étant le principe actif de l'aspirine connu pour son effet anti-inflammatoire, l'Ideal BioStent a un double effet antiprolifératif et anti-inflammatoire.¹¹⁸ Le PAE s'hydrolyse en acide salicylique et acide sébacique, un composé inerte déjà utilisé dans le traitement de certains cancers.¹¹⁹ Une première étude clinique WHISPER sur 11 patients a donné lieu à une prolifération intimale importante attribuée à une quantité de sirolimus trop faible et une cinétique de libération trop rapide. Une deuxième génération a été développée avec une géométrie optimisée permettant des mailles plus fines, une charge en principe actif plus important et une libération plus lente. Elle est actuellement en court d'évaluation pré-clinique.¹¹⁶

L'**AMS** n'est pas en polymère mais en métal bioabsorbable. La première version est composée de 93 % de magnésium et le reste de zirconium, Yttrium et d'éléments rares. Il est donc radio-opaque. Les propriétés mécaniques de cet alliage proche de celles du 316L permettent des mailles plus fines que celles des stents en polymère mais son hydrolyse en sels organiques inertes est plus rapide. D'une première étude clinique PROGRESS AMS sur 63 patients ont résulté des taux de TLR importants (39,7 % à 4 mois et 45,0 % à 12 mois) imputés à une dégradation trop rapide.⁶⁶ Une nouvelle génération, DREAMS 1.0, a donc été mise au point, l'alliage a été légèrement modifié afin d'allonger le temps de dégradation, les mailles ont été affinées et la structure a été recouverte d'une matrice biorésorbable éluant du paclitaxel. L'évaluation clinique chez 46 patients, BIOSOLVE-1, après 1 an, a donné lieu à seulement 7 % MACE mais la différence entre le diamètre de la lumière avant et après pose de stent reste élevée ($0,52 \pm 0,39$ mm). Le sirolimus a donc pris la place du paclitaxel, les résultats pré-cliniques de DREAMS 2.0 sont encourageant mais demandent à être confirmés lors d'une étude chez l'homme.¹¹⁶

D'autres stents comme le **ART18Z** de Arterial Remodeling Technologies, l'**Amaranth** de Amaranth Medical Inc en PLLA, le **DeSolve** d'Elixir Medical en-PLLA, le **Xinsorb** de Huaan Biotechnology en poly(aspartic acid-co-lactide), poly(ϵ -caprolactone) et polyglycolide, l'**Acute** de OrbusNeich en poly-L-lactide-co ϵ -caprolactone, PDLA et PLLA, le **MeRes** de Meril en PLA et le **FADES** de Zorion Medical en PLGA et Mg sont actuellement à l'étude en phase pré-clinique ou en début de phase clinique.

Tableau 9 : BRS testés ou en cours d'évaluation clinique^{66,116}

Fabriquant	Stent	Photo Géométrie	Matériaux Structure	Revêtement	Principe actif et cinétique	Epaisseur des mailles (µm)	Maintient d'une force radiale (jours)	Dégradation complète (mois)	Etude clinique	Statut
Kyoto Medical	Igaki-Tamai		PLLA	∅	∅	170	180	24	FIM	CE
Abbott Vascular	BVS 1.0		PLLA	PDLLA	Everolimus 80% en 30j	156	Quelques semaines	24-36	ABSORB A	Testé et modifié
	BVS 1.1		PLLA	PDLLA	Everolimus 80% en 30j	156	180	24-36	ABSORB B ABSORB EXTEND ABSORB II	CE
REVA Medical	REVA I		Poly(DTE carbonate) iodé	∅	∅	200	90-180	12-18	RESORB	Testé et modifié
	ReZolve™		Poly(DTE carbonate) iodé	∅	Sirolimus 80% en 30j	114-228	90-180	24	RESTORE	Etude clinique en cours
Xenogenics	BTI		PAE	SA AA	Sirolimus 100% en 30j	200	90	6	WHISPER	Testé et modifié
	Ideal™		PAE	SA AA	Sirolimus -	175	-	-	-	Etude clinique en cours
Biotronik	AMS I		Mg	∅	∅	165	Quelques semaines	2	PROGRESS AMS FIM	
	DREAMS		Mg	PLGA PLLA	Paclitaxel Sirolimus	125 125	90-180 90-180	12 12	BIOSOLVE I -	Clinique Pré-clinique

PLLA : Poly-L-lactic acid
FIM : First in man
PDLA : Poly-D-L-lactic acid
DTE : Desaminotyrosyl-tyrosine ethyl ester

PAE : poly-anhydride ester
SA : Salicylic acid

AA : Adipic acid
PLGA : Poly-lactide-co-glycolide

4. Le développement d'un Dispositif Médical Implantable (DMI), aspects réglementaires

4.1. Le DM, définition

L'article L5211-1 du Code de la santé publique définit les dispositifs médicaux comme suit :

*« On entend par **dispositif médical** tout instrument, appareil, équipement, matière, produit, à l'exception des produits d'origine humaine, ou autre article utilisé seul ou en association, y compris les accessoires et logiciels nécessaires au bon fonctionnement de celui-ci, destiné par le fabricant à être utilisé chez l'homme à des fins médicales et dont l'action principale voulue n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques ou immunologiques ni par métabolisme, mais dont la fonction peut être assistée par de tels moyens. [...]*

Les dispositifs médicaux qui sont conçus pour être implantés en totalité ou en partie dans le corps humain ou placés dans un orifice naturel, et qui dépendent pour leur bon fonctionnement d'une source d'énergie électrique ou de toute source d'énergie autre que celle qui est générée directement par le corps humain ou la pesanteur, sont dénommés dispositifs médicaux implantables actifs. »

Cette définition regroupe un nombre très vaste de dispositifs allant des pansements aux implants chirurgicaux en passant par les lunettes de vue ou les poches de transfusion sanguine. Afin d'adapter les exigences à chacun, différentes classes ont été définies. Les classes I, IIa et IIb regroupent les dispositifs non invasifs. La directive 93/42/CEE définit la classe III comme celle des dispositifs médicaux qui ont un potentiel très sérieux de risque, c'est à dire des dispositifs incorporant des produits d'origine animale, des implants chirurgicaux long terme – plus de 30 jours – ou biodégradables, des dispositifs en contact avec le système nerveux central, le cœur et le système sanguin, des dispositifs incorporant une substance qui, lorsqu'elle est utilisée séparément, est considérée comme médicamenteuse.

C'est donc à cette dernière qu'appartiennent les DMI dont les stents font partie.

4.2. Réglementation

Le chemin du concept à la mise sur le marché d'un stent est long et sinueux. Avant d'être implanté chez le patient les DMI, et en particulier ceux de classe III, doivent suivre une démarche scientifique qui permettra de juger de leur innocuité et de leur efficacité.

Au niveau européen, le marquage CE est obligatoire pour la mise sur le marché de DMI de classe III pour attester que ce dernier satisfait aux exigences des différentes directives sur la réglementation des DMI. Il est apposé sous la responsabilité du fabricant qui doit chercher à réduire au maximum les risques liés au produit, à la stérilité et à l'emballage/étiquetage selon le besoin, en plus d'assurer une évaluation préclinique (biocompatibilité *in vitro* et *in vivo*) puis clinique (études de faisabilité, démonstration du

bénéfice clinique) (Figure 22). A l'échelle nationale, différents organismes contrôlent l'évaluation des matériaux pour un usage biomédical comme l'Agence National de Sécurité du Médicament et des Produits de Santé (ANSM) en France ou la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis qui délivre une approbation de mise sur le marché comparable au marquage européen.

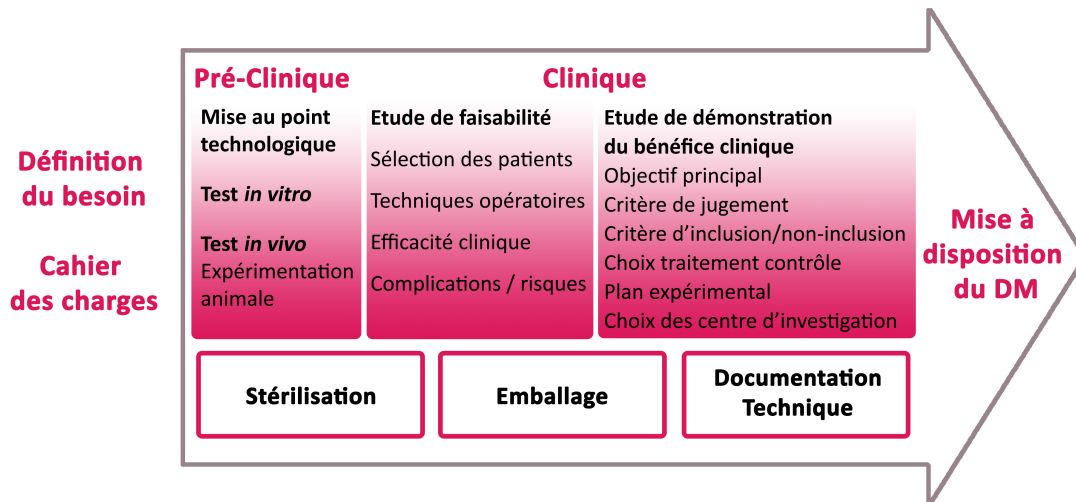


Figure 22 : Parcours d'un DMI (d'après Cudennec)¹²⁰

Afin d'harmoniser l'évaluation et la certification des DMI, l'Organisation International de normalisation (ISO) a établi des normes qui définissent les exigences et spécifications pour assurer la sûreté, la qualité et fiabilité des matériaux ainsi que de leurs constituants chimiques, de leurs produits de dégradation, de leurs métabolites et des autres composants libérés. Ainsi pour l'évaluation biologique de dispositifs médicaux des DMI, la norme ISO 10993, divisée en 20 sections, guide les essais à effectuer pour la validation (Tableau 10). L'objectif est de limiter les risques liés au dispositif et, à plus long terme, de limiter le passage sur le marché de dispositif non satisfaisant. En amont de la validation, ces différents tests peuvent et doivent être pris en compte pour la mise au point du dispositif.

Tableau 10 : Norme ISO 10993

Partie	Titre
1	Évaluation et essais au sein d'un processus de gestion du risque
2	Exigences relatives à la protection des animaux
3	Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction
4	Choix des essais pour les interactions avec le sang
5	Essais concernant la cytotoxicité in vitro
6	Essais concernant les effets locaux après implantation
7	Résidus de stérilisation à l'oxyde d'éthylène
8	Sélection des matériaux de référence
9	Cadre pour l'identification et la quantification des produits potentiels de dégradation
10	Essais d'irritation et de sensibilisation cutanée
11	Essais de toxicité systémique
12	Préparation des échantillons et matériaux de référence
13	Identification et quantification de produits de dégradation de dispositifs médicaux à base de polymères
14	Identification et quantification des produits de dégradation des céramiques
15	Identification et quantification des produits de dégradation issus des métaux et alliages
16	Conception des études toxico-cinétiques des produits de dégradation et des substances relargables
17	Établissement des limites admissibles des substances relargables
18	Caractérisation chimique des matériaux
19	Caractérisations physicochimique, morphologique et topographique des matériaux
20	Principes et méthodes relatifs aux essais d'immunotoxicologie des dispositifs médicaux

4.3. Biocompatibilité

4.3.1. Définition

La Société Européenne des Biomateriaux définit un **biomatériau** comme « *un matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques, participant à la constitution d'un dispositif à visée diagnostique, à celle d'un substitut de tissu ou d'organe ou encore à celle d'un dispositif de suppléance (ou d'assistance) fonctionnelle* »

Pr D.F. Williams, éditeur en chef du journal *Biomaterials*, a défini en 1987 la **biocompatibilité** comme « *la capacité d'un matériau d'accomplir une application spécifique avec une réaction de l'hôte adaptée* »¹²¹

Tout matériau implanté va entraîner une réaction de l'hôte plus ou moins importante, des interactions locales et systémiques entre le biomatériau et les tissus peuvent entraîner des complications chez le patient (Figure 23).

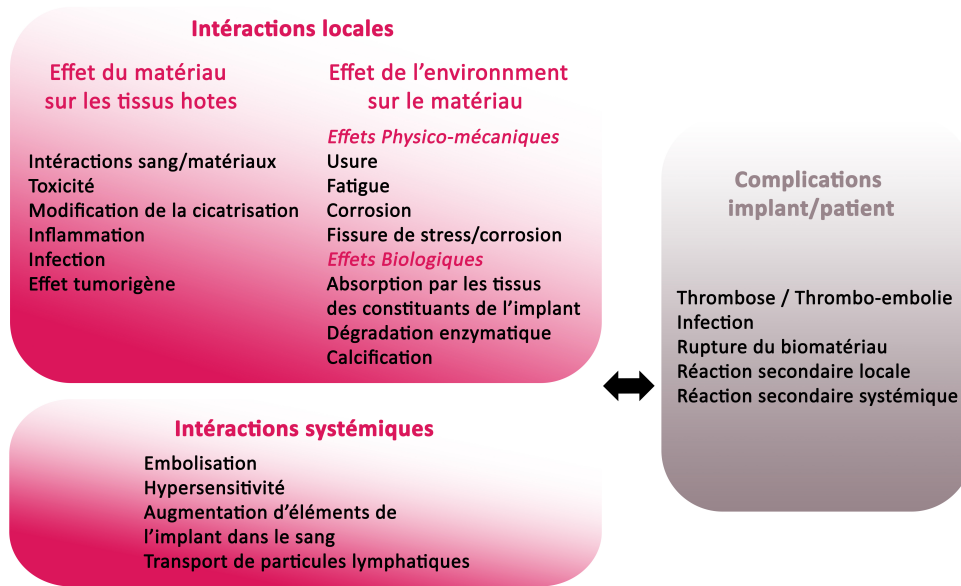


Figure 23 : Intéactions tissu-biomatériau d'après Schoen¹²²

Pour s'assurer de la biocompatibilité d'un matériau, quatre points doivent donc être évalués :

1/La toxicité du matériau et de ses éventuels produits libérés, tels des solvants, des catalyseurs, des microparticules, des ions, etc. Trois parties de la norme ISO 10993 sont dédiées à cet effet, la 5 « *Essais concernant la cytotoxicité in vitro* », la 11 « *Essais de toxicité systémique* » et la 16 « *Conception des études toxico-cinétiques des produits de dégradation et des substances relargables* ».

2/Les interactions avec les organismes extrinsèques. Les interactions fongiques et bactériennes, particulièrement la capacité du matériau à limiter l'adhésion et le développement des champignons et bactéries, doivent être mesurées ainsi que l'efficacité de la stérilisation.

3/Les effets mécaniques. L'impact de la forme de l'implant sur la réponse cellulaire via des micromouvements a été démontré en 1976 par Matlaga et al.¹²³ Des implants circulaires, pentagonaux et triangulaires implantés *in vivo* en intramusculaire chez le rat ont entraîné une réaction accrue dans l'ordre des formes citées. Le design des DMI doit donc viser à limiter les frottements et la présence d'angle ou d'une différence de dureté avec les tissus voisins.

4/Les interactions cellules/matériau qui sont nombreuses. Il faut tenir compte de l'adsorption des protéines à la surface du matériau qui précède les cellules et module les réponses de ces dernières.

La réaction à corps étranger est une forme spécifique d'inflammation consistant en l'activation des macrophages qui cherchent à phagocyter les biomatériaux, ils peuvent dès lors libérer des cytokines qui vont stimuler l'inflammation et la formation de fibrose et former des cellules géantes multi nucléés qui ensuite forment une chape autour de l'implant (Figure 24).

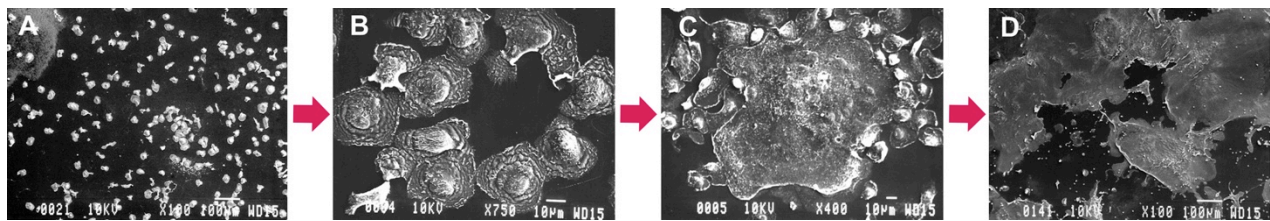


Figure 24 : Progression morphologique d'une réaction à corps étranger¹²⁴

Images MEB d'une surface de polyurethane après implantation *in vivo*

A – Adhésion des monocytes (0 j) B – Evolution des monocytes en macrophages (3 j)

C – Fusion des macrophages (7 j) D – Cellules géantes multinuclées (14 j)

4.3.2. Évaluation *in vitro*

Une première évaluation de ces quatre points *in vitro* est souvent moins coûteuse et permet de comparer différents matériaux, différentes concentrations afin de faire une sélection pour un passage *in vivo*. La grande majorité des matériaux et produits chimiques est néfaste à partir d'un certain seuil, l'objectif est donc de déterminer l'effet en fonction de la dose et par la suite de se placer dans une proportion de moindre danger.

La première variable à définir est celle de l'échantillon de matériau testé, la surface de contact appropriée, sa forme, le test d'un ensemble de matériau pour observer d'éventuelles interactions entre eux dans le cas, par exemple, d'un composite. La norme ISO 10993-12¹²⁵ apporte un grand nombre de réponses et établit des paramètres d'échantillon en fonction du type de matériau et de ce qui est évalué.

Concernant les tests de génotoxicité, cancérogénèse et impact sur la reproduction, la norme ISO 10993-3¹²⁶ propose des tests *in vivo* nécessitant beaucoup de temps et d'animaux. Cependant il existe des alternatives *in vitro* à l'évaluation de la génotoxicité, c'est à dire, de la capacité d'un matériau, d'un de ses constituants chimiques, de ses produits de dégradation, libération ou contaminant à avoir un impact sur l'ADN ou le processus génétique. L'Organisation de Coopération et Développement Economique (OCDE) dans le cadre des lignes directrices pour les essais des produits chimiques, section 4, effet sur la santé, propose ce type de test, notamment l'essai n°471 de mutation réverse sur des bactéries, l'essai n°473 d'aberration chromosomique *in vitro* chez le mammifère et l'essai n°476 de mutation génique sur les cellules de mammifère.

Pour la cancérogénèse et l'impact sur la reproduction, la norme ISO et l'OCDE conseillent des tests *in vivo*. Toutefois un test de transformation cellulaire ou un test avec des cellules souches embryonnaire peuvent respectivement être une alternative *in vitro* fournissant des informations sur ces deux points.¹²²

Afin de réduire l'utilisation d'animaux, d'autres tests sont maintenant réalisés *in vitro*. Parmi eux un test permettant de détecter les endotoxines et les effets pyrogène, le test de limulus. Celui-ci est particulièrement indiqué en cas d'utilisation de polysaccharide. La limule, *limulus polyphemus*, possède une hémolymphe, liquide circulatoire chez les arthropodes analogue au sang, contenant des cellules nommées amébocytes. Le test utilise un lysat d'amébocytes de limules (LAL) ayant pour propriété de coaguler en présence d'infimes quantités d'endotoxines bactériennes. Le LAL est donc mis en contact du matériau à 37°C pendant 1h et, s'il se gélifie, le résultat est alors positif.

La cytotoxicité, capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes sur les cellules qui peuvent induire leur mauvais fonctionnement, leur nécrose ou apoptose, est largement évaluée *in vitro*. La norme ISO 10993-5¹²⁷ définit, en fonction du type de matériau et d'implant, l'échantillon à évaluer : extraits liquides de matériau, contact direct ou indirect via une diffusion dans l'agar ou à travers un filtre. L'évaluation de la cytotoxicité peut être qualitative, par observation de la morphologie des cellules en contact avec l'échantillon, ou quantitative comme le recommande la norme via quatre tests :

- 1/ Par fixation du rouge neutre, dosage colorimétrique avec des cellules BALB/c 3T3
- 2/ Par formation de colonies, comptage cellulaire avec des cellules V79
- 3/ Par MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-bromure de diphényltétrazolium), dosage colorimétrique avec des cellules L929 exemptes de mycoplasme
- 4/ Par XTT (hydroxyde de 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-5-[(phénylamino)carbonyl]-2H-tétrazolium), dosage colorimétrique avec des cellules L929 exemptes de mycoplasme.

Enfin, les tests *in vitro* peuvent être plus spécifiques et servir de preuve de concept. Pour cela des tests d'adhésion, de prolifération et de migration des cellules cibles, en contact direct avec le DMI et jouant un rôle dans le bénéfice de celui-ci peuvent être pertinents.

Les études *in vitro* permettent de répondre à des questions précises, les modèles étant très simplifiés et les mécanismes isolés. Si ces tests sont indispensables et facilitent le screening, ils ne sont néanmoins pas suffisants car il ne permettent pas encore d'évaluer l'ensemble des paramètres garantissant le bon fonctionnement et la sécurité du DMI et certains effets observés *in vitro* ne le sont pas forcément dans le modèle multifactoriel qu'est l'*in vivo*.

4.3.3. Évaluation *in vivo*

L'étude *in vitro* doit donc être confirmée et approfondie *in vivo*. Toute étude *in vivo* doit être minutieusement et globalement pensée afin de suivre au mieux la règle éthique des 3R :

- **Remplacer** : chaque fois que cela est possible, remplacer les expériences sur l'animal par des expériences *in vitro* ou remplacer les expériences sur des animaux "sensibles" (primates, chien, chat) par des expériences sur des animaux "moins sensibles" (rongeurs, poissons, insectes)
- **Réduire** : par une planification rigoureuse des expériences, réduire au minimum indispensable le nombre d'animaux utilisés tout en restant statistiquement significatif.
- **Raffiner** : par l'amélioration des techniques opératoires, réduire la souffrance et le stress de l'animal tout en obtenant des résultats de meilleure qualité qui n'auront pas à être répétés.

Le choix du modèle animal constitue donc un point crucial. Le modèle doit répondre à une ou plusieurs questions précises, sans chercher à mimer l'intégralité des réactions humaines. Il faut donc prendre en compte les avantages et inconvénients du modèle choisi pour l'application clinique humaine. La taille qui peut être contrainte par celle de l'implant ou une réaction similaire à celle observée chez l'homme peuvent être des paramètres motivant le choix. Ainsi pour les valves cardiaques, le mouton est communément utilisé car il a un cœur de taille adéquate à la pose d'une valve destinée à l'homme et une tendance naturelle à former des calcifications, complication majeure chez l'homme.¹²² Néanmoins, il n'a pas naturellement tendance à thromboser, autre complication lors de l'implantation clinique. Les propriétés thrombogènes de la valve doivent donc être vérifiées par un autre biais.¹²²

Concernant les stents, le choix du modèle est délicat car l'ensemble des animaux y compris les primates non humains a tendance à réendothélialiser et à cicatrifier une lésion artérielle rapidement. Le modèle coronarien du cochon est classiquement employé pour leurs évaluations, cependant le modèle d'implantation dans l'iliaque de lapin a démontré une endothélialisation plus lente et une inflammation modérée plus proche des réactions humaines¹²⁸.

Les tests *in vivo* peuvent être pratiqués dans différentes phases du développement d'un DMI. Des premiers tests peuvent être réalisés dans un stade précoce, lors de la mise au point d'un nouveau biomatériau afin d'orienter la suite des recherches. Au stade préclinique ils sont souvent indispensables afin de valider l'ensemble du produit, son processus de fabrication et de stérilisation.

L'exposition ou le contact même bref avec certains biomatériaux et les polluants qu'ils peuvent libérer peut provoquer une réaction allergique ou de sensibilisation. Cette réaction doit être évaluée dans un modèle adapté à l'utilisation du DM : lieu de contact (peau, œil, muqueuse), fréquence, durée d'exposition, etc. Le cobaye est un modèle prédominant dans ce type d'analyse. La norme ISO définit l'irritation comme une réponse inflammatoire locale des tissus à un composé chimique n'impliquant pas une réponse immunitaire systémique et la réaction intradermique comme réaction locale à une implantation sous cutanée. Si le DM expose le patient à ce genre de risque, la

sécurité du biomatériau peut être évaluée dans un modèle lapin albinos.¹²²

La toxicité systémique, effet néfaste *in vivo* sur les tissus ciblés et organes éloignés du contact, requière quant à elle un choix réfléchi des produits d'extraction testés. Elle peut être évaluée dans différentes phases, aiguë dans les 24h, subaiguë durant 14 à 28 jours avec une ou plusieurs doses ou expositions par jour, chronique durant au moins 10 % de la durée de vie soit environ 90 jours chez le rat avec une ou plusieurs doses ou expositions par jour. Les tests de toxicité chronique peuvent dans le même temps permettre de déterminer le potentiel tumorigène du biomatériau et de ses polluants, et ainsi d'évaluer la cancérogénicité et toxicité dans une même étude.

De nombreux modèles existent : souris, rat ou lapin via une exposition orale, cutanée, sous cutanée, par inhalation, intraveineuse ou intrapéritonéale. Un test simple est celui de l'effet pyrogénique par mesure de l'augmentation de température chez le lapin après mise en contact ou implantation de l'échantillon à tester. Toutefois, le test *in vitro* de limulus peut être une alternative.

La génotoxicité, elle aussi évaluable en partie *in vitro*, peut être évaluée *in vivo*. Le test le plus commun est celui des micronoyaux chez le rongeur mais il en existe d'autre comme, par exemple, l'essai n°483 proposé par l'OCDE sur l'aberration chromosomique sur moelle osseuse de mammifère. Lorsque le DM le justifie, les impacts sur la reproduction, le développement embryonnaire et les stades prénatal et postnatal doivent être analysés.

L'évaluation de la réponse immunitaire n'a pas forcément lieu d'être pour les matériaux synthétiques, mais peut se révéler nécessaire pour ceux d'origine naturelle comme le collagène ou le péricarde decellularisé. Si besoin, l'immunotoxicité, effet secondaire impactant le fonctionnement ou la structure du système immunitaire de manière directe ou via un autre système, est plus souvent estimée via des tests fonctionnels du système immunitaire.

L'implantation du DMI permet également de vérifier sa fonctionnalité et sa bonne interaction avec les tissus voisins. Parfois, pour cause de taille par exemple, le lieu d'implantation ne correspond pas à l'implantation clinique mais il doit être choisi de manière à refléter les mécanismes mis en jeux. Des analyses macroscopiques et microscopiques permettent de déterminer si le DM répond au besoin. Les analyses histologiques peuvent être complétées par d'autres tests comme par exemple de l'immuno-histologie afin de définir les types cellulaires.

Enfin, dans le cas de matériau dégradable l'implantation *in vivo* permet d'évaluer la cinétique de dégradation du biomatériau ainsi que l'impact des produits de dégradations.

4.4. Hémostase d'un matériau

Les interactions sang/DMI jouant un rôle majeur dans le cas d'un stent, il est donc nécessaire de s'y intéresser plus en détails. Afin de comprendre les tests utilisés, il est indispensable dans un premier temps d'expliquer les mécanismes qui interviennent.

4.4.1. L'hémostase

L'**hémostase** est l'ensemble des mécanismes qui assurent le maintien du sang à l'état fluide à l'intérieur des vaisseaux. Deux phénomènes se déroulent de manière concomitante en cas de blessure : l'**hémorragie** ou écoulement du sang hors du vaisseau par la formation d'un caillot et la limitation de cette formation thrombotique à la zone lésée pour empêcher l'obstruction du vaisseau lors de l'arrêt de l'hémorragie. L'hémostase se décompose classiquement en trois temps : le **clou plaquettaire**, la **coagulation** et la **fibrinolyse**.

D'une manière naturelle, tout matériau mis en contact avec le tissu sanguin induit la formation d'un thrombus. C'est pour cela que la norme NF EN ISO 10993-4, impose que les DM en contact avec le sang tels que les stents fassent l'objet de tests évaluant leur interaction avec le tissu sanguin. Ces évaluations portent sur la thrombose, la coagulation, les interactions avec plaquettes, l'hématologie et le système du complément.

Quelques prérequis sont donc nécessaires pour mieux comprendre les tests demandés.

4.4.1.1. L'hémostase primaire :

Lorsqu'une brèche vasculaire se constitue, la première réaction de l'organisme est une **vasoconstriction** localisée. Ce rétrécissement du diamètre du vaisseau permet un arrêt ou une réduction du flux sanguin. Une altération du vaisseau entraîne la mise à nu des structures sous endothéliales (Figure 25) et notamment du **collagène**. La GP Ib à la surface des plaquettes permet alors l'**adhésion plaquettaire** via le **facteur de Von Willebrand** (vWF) – polymère présent dans le plasma, les plaquettes et le sous-endothélium – qui sert de ciment. Dès lors, les plaquettes adhérentes s'activent et recrutent d'autres plaquettes circulantes. Cette activation entraîne une modification des GP IIb et IIIa de surface qui permet la fixation du **fibrinogène** – dimère du plasma – en présence de calcium. Le fibrinogène crée alors des ponts entre les plaquettes ce qui aboutit à la formation du **clou plaquettaire** aussi appelé **thrombus blanc**.

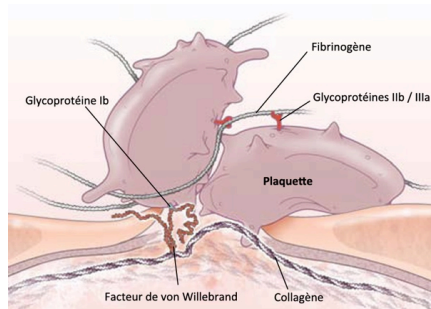


Figure 25 : Formation du clou plaquettaire (d'après Borissoff et al.)¹²⁹

4.4.1.2. L'hémostase secondaire :

Ce thrombus est cependant fragile et doit être consolidé. Une cascade de réactions enzymatiques se déclenche : c'est la phase de **coagulation**. Elle met en jeu différents **facteurs de la coagulation** qui, à l'état activés, vont entraîner l'activation d'autres facteurs. L'aboutissement est la transformation du fibrinogène soluble dans le sang en **fibrine** insoluble via une enzyme jouant un rôle central la **thrombine**. Deux **voies d'activation** sont mises en évidence : la **voie intrinsèque**, ou **endogène**, impliquant uniquement des éléments plasmatiques et la **voie extrinsèque**, ou **exogène**, initiée par le **facteur tissulaire** (FT) (Figure 26). Cependant, *in vivo*, ces deux voies se mélangent et il est difficile de quantifier l'impact de l'une ou de l'autre lors de la coagulation. Le réseau de fibrine ainsi formé emprisonne les globules rouges ce qui forme un **thrombus rouge**.

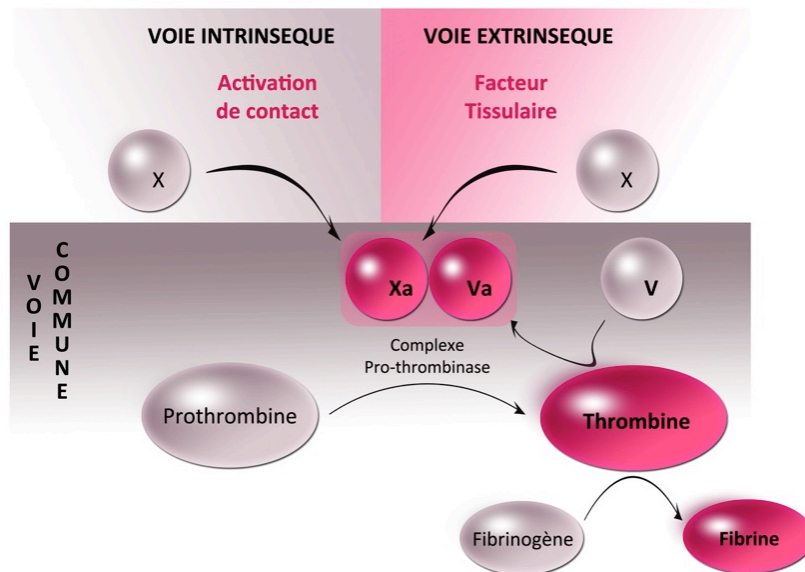


Figure 26 : Cascade de la coagulation

4.4.1.3. La fibrinolyse :

Afin de limiter l'extension et de maintenir le caillot un troisième mécanisme se déclenche, il s'agit de la **fibrinolyse**. Lorsque se forment des traces de fibrine, les cellules endothéliales libèrent un **activateur tissulaire** de la fibrinolyse, le t-PA et la **pro-urokinase** s'active en **urokinase**, l'u-PA. Celui-ci active le **plasminogène** au niveau du caillot qui se transforme en **plasmine**, une puissante enzyme protéolytique capable de dégrader le caillot de fibrine en produisant des **produits de dégradation de la fibrine**. La réaction s'achève lorsque la plasmine est en excès, elle passe dans le courant plasmique et est neutralisée par des inhibiteurs.

4.4.2. Les tests

En ce qui concerne les stents, la norme conseille d'évaluer la thrombose et l'hémolyse *in vitro* et *in vivo*.¹³⁰

Pour l'évaluation des effets thrombogènes de la mise en place d'un stent, cinq tests sont proposés, une observation MEB des plaquettes, des leucocytes et de la fibrine, l'évaluation du pourcentage d'occlusion et de la réduction du flux, une observation via le marquage des anticorps des composant thrombotiques et une analyse histologique après implantation.

Concernant le pourcentage d'occlusion, il s'agit après explantation d'évaluer la surface couverte par un thrombus. La réduction du flux quant à elle peut être quantifiée *in vivo* ou par différence pré-implantation et post-explantation. Il faut cependant différencier la part due à la formation d'un thrombus de celle due à une éventuelle formation néo-intimale.

L'observation MEB, quant à elle permet d'évaluer l'adhésion et l'activation des plaquettes par évaluation de leur densité et de leur morphologie. La morphologie des leucocytes ainsi que le dépôt de fibrine indiquent également si le matériau est pro-thrombogène.

Une estimation plus quantitative peut être faite par marquage des anticorps spécifiques à la fibrine, au fibrinogène et à la membrane plaquettaire après exposition de l'implant au sang puis rinçage des éléments non adhérents.

L'hémolyse est la destruction ou l'endommagement partiel des érythrocytes aboutissant à la libération de l'hémoglobine qu'ils contiennent dans le plasma sanguin. Elle peut être provoquée par des forces mécaniques, la membrane des érythrocytes semi-perméable peut rompre sous l'effet de la pression osmotique ou être endommagée par des forces de cisaillement sanguines trop élevées. Des facteurs biochimiques peuvent provoquer un changement de structure de la membrane impactant sa raideur et son élasticité et donc sa résistance.

La méthode la plus simple d'évaluer l'hémolyse est donc la quantification de la proportion d'hémoglobine libérée dans le surnageant comparée à la quantité totale disponible initialement.

5. Développement de nouveaux revêtements

5.1. Copolymère de dextrane-poly(buthyle méthacrylate)

5.1.1. Le dextrane

Le dextrane est un polysaccharide synthétisé par des bactéries de la famille des *lactobacillus* (Figure 27). De formule $(C_6H_{10}O_5)_n$ il est constitué d'unité α -D-glucose liées entre elles par à 95% par des liaisons 1-6 et 5% par des liaisons 1-5.

Déjà utilisé dans le domaine alimentaire et médical notamment pour le remplacement de plasma ou sous forme sulfaté pour certain revêtement de stents le dextrane a démontré sa biocompatibilité.^{61,131}

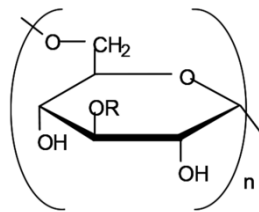


Figure 27 : Dextrane

5.1.2. Le PBMA

Le poly(buthyle méthacrylate) (PBMA) (Figure 28) est un polymère synthétique largement utilisé dans le domaine médical notamment pour les revêtements de nombreux DES (3.5.2. Revêtements actifs p21).

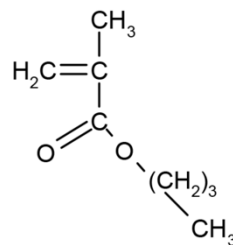


Figure 28 : Butyle Méthacrylate

5.1.3. La polymérisation radicalaire

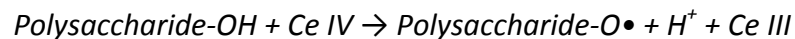
La polymérisation radicalaire est une réaction en chaîne où des radicaux libres sont l'espèce propagatrice. Ces radicaux libres résultent d'une rupture homolytique de liaisons covalentes et ont une durée de vie très brève liée à leur grande réactivité. Trois étapes sont distinguées : 1) l'amorçage au cours duquel les radicaux sont formés, 2) la propagation où les précédents radicaux en forment de nouveaux et 3) la terminaison qui conduit à la disparition des espèces radicalaires.

L'**amorçage**, également nommée initiation, comprend deux réactions successives.

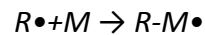
La première est la génération de radicaux libres par thermolyse, photolyse ou processus redox. C'est ce dernier processus qui sera utilisé lors de notre étude. Il s'agit de **réactions d'oxydo-réduction** qui sont réalisées par action des cations métalliques,

comme le cérium IV, le plomb IV, le cobalt III ou de l'argent II sur des acides carboxyliques, conduisant à la formation d'un radical dit primaire.

Dans notre étude, il s'agit d'une réaction du type suivant :

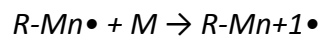


La deuxième réaction est l'addition du radical primaire (R) sur une première unité monomère (M) pour former le premier « maillon » de la chaîne polymère en croissance :



D'une manière générale la première réaction constitue l'étape lente et gouverne donc la vitesse globale du processus d'amorçage.

La **propagation**, principale étape de la polymérisation radicalaire, est l'étape au cours de laquelle la chaîne macromoléculaire se forme par addition successive d'unités monomères sur le « polysaccharide-radical » en croissance. Chaque radical formé est consommé par la réaction suivante selon le modèle ci-dessous.



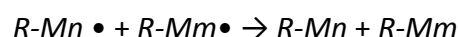
Cette étape de polymérisation est déterminante pour la structure et les propriétés du matériau résultant. Pour obtenir un processus efficace, il est nécessaire que la concentration radicalaire soit faible afin que les réactions de terminaison par combinaison de radicaux puissent être négligées.

En effet, les réactions de **terminaisons** provoquent la disparition des radicaux. La croissance des chaînes peut être interrompue à chaque instant par ces réactions au cours desquelles deux radicaux polymères se neutralisent par recombinaison ou par dismutation.

Dans le premier cas, la **réaction de recombinaison**, deux macro-radicaux reforment une liaison covalente :



Dans le deuxième cas, la **réaction de dismutation**, les deux macro-radicaux donnent lieu à une réaction de transfert d'hydrogène, suivie d'une recombinaison.



La proportion relative de ces deux modes de terminaison dépend essentiellement du type de monomère employé, de l'accessibilité des sites radicalaires, c'est-à-dire de l'encombrement stérique des sites actifs et de la concentration des radicaux. En chimie radicalaire, il est souvent utile de chercher à diminuer au maximum l'influence de la terminaison par recombinaison puisqu'il s'agit d'un processus souvent mal contrôlé.

5.2. Résultats préliminaires

Notre travail fait suite à celui du Dr. Derkaoui S.M. *et al.* portant sur le copolymère de dextrane et PBMA (Dex-PBMA) obtenu par polymérisation radicalaire. Les premiers résultats obtenus avec le Dex-PBMA en font un matériau très prometteur pour le revêtement de stent.^{2,132}

5.2.1. Caractérisation physico-chimique

Les Dex-PBMA est obtenu par polymérisation radicalaire en milieu très dilué. Le greffage du PBMA sur le dextrane est confirmé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). Les spectres du copolymère présentent bien la bande d'absorption correspondant à la liaison C=O du PBMA ainsi que la bande correspondant à la liaison OH du dextrane. Le caractère semi-quantitatif de la FTIR a permis, via la comparaison de l'intensité du pic C=O du PBMA seul et du Dex-PBMA, d'évaluer les proportions de dextrane (11% en masse) et de PBMA (89% en masse) dans le copolymère.

Le Dex-PBMA est soluble dans un mélange de THF/H₂O (92:8 v/v), ce qui permet de le mettre sous forme de films et d'éprouvettes d'essai. La mesure d'angle de contact, la microscopie à force atomique et la calorimétrie différentielle permettent respectivement de caractériser la balance hydrophile/hydrophobe du matériau, de déterminer sa rugosité Ra (Figure 29A) et d'évaluer la température de transition vitreuse Tg. La présence de dextrane, polymère hydrophile, diminue l'angle de contact ainsi que la rugosité et augmente légèrement la Tg (Tableau 11).

Tableau 11 : Propriétés du Dex-PBMA

Matériaux	Angle de contact	Ra	Tg (°C)
Dextrane	-	-	152
PBMA	98,9 ±2,1	1,9	28
Dex-PBMA	79,4 ±2,1	1,6	31

Le dextrane modifie également les propriétés mécaniques. Ainsi, contrairement au PBMA qui est cassant, le Dex-PBMA, sous forme d'éprouvette peut résister à une élongation de 380 % (Figure 29B), sous forme de revêtement sur des disques d'acier 316L à une déformation de 25 % (Figure 29C). Cette élasticité est un paramètre crucial pour le revêtement de stent. Comme la Figure 29D l'illustre, le revêtement Dex-PBMA ne craque pas lors du déploiement du stent.

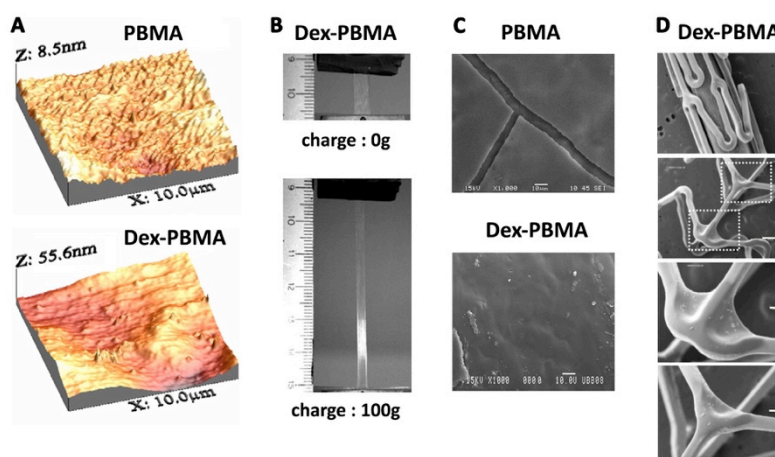


Figure 29 : Caractérisation du Dex-PBMA

A - Microscopie à force atomique de films de PBME et Dex-PBMA B- Test de traction du Dex-PBMA C- MEB de déformation de 25% de disques 316L recouverts de PBMA ou Dex-PBMA D- MEB d'un stent recouvert de Dex-PBMA avant et après déploiement

5.2.2. Tests *in vitro*

Le Dex-PBMA a ensuite été évalué *in vitro* pour évaluer la réaction avec les cellules de la paroi artérielle. Pour une première approche des lignées ont été utilisées. D'une part des cellules endothéliales humaines de veine de cordon ombilicale (HUVEC, Human Umbilical Vein Endothelial Cell) et d'autre part des cellules musculaires lisses de lapin Rb1 (VSMC, Vascular Smooth Muscle Cell). Dans un premier temps, leurs proliférations ont été testées sur des films de 15 mm de diamètre afin de comparer le PBMA et le Dex-PBMA. Après 5 jours, les HUVEC ont atteint la confluence sur le Dex-PBMA tandis qu'elles n'ont pas proliféré sur le PBMA. A l'inverse les VSMC ont proliféré environ 5 fois plus sur le PBMA que sur le Dex-PBMA. De plus, des tests de migration ont montré qu'après dénudation avec un cône de pipette de 10 μ L seulement 32 h étaient nécessaires aux HUVEC pour être à nouveau à confluence sur le Dex-PBMA. Dans un deuxième temps la prolifération a été évaluée sur des disques en acier 316L recouvert de Dex-PBMA ou nu. Après 5 jours, 14 fois plus d'HUVEC et 1,6 fois moins de VSMC sont dénombrées sur le Dex-PBMA comparé au métal nu (Figure 30A). Figure 30B, un ensemencement directement sur les stents puis un marquage du cytosquelette des cellules à la phalloïdine FluorProbe 547 rouge et du noyau au DAPI bleu illustrent cette tendance.

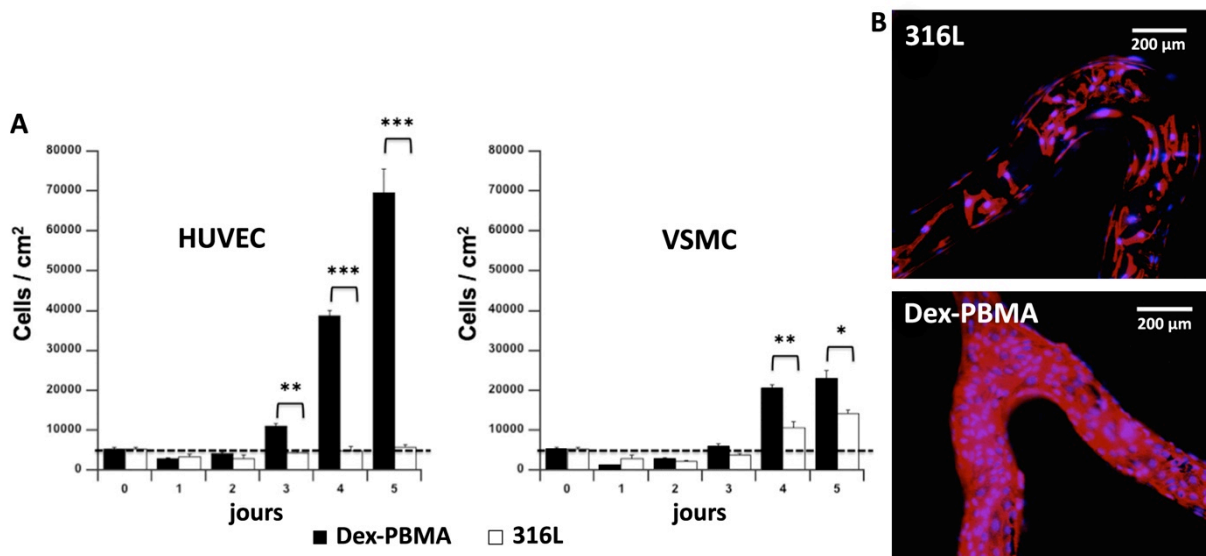


Figure 30 : HUVEC et VSMC sur une surface 316L recouverte de Dex-PBMA ou nue
A – Prolifération sur les disques B – Stents après 5 jours

6. Bilan et mise en perspective

Malgré la diversité de stratégies, de matériaux de structure, de revêtement et de molécules actives, les stents disponibles sur le marché semblent ne pas être optimum. L'occurrence de la resténose ou le la thrombose tardive sur stent (LST) étant encore un souci. Même si les dernières générations de stent délivrant localement des molécules antiprolifératives ont un impact significatif sur la diminution de la resténose, l'une des principales complications est la LST dont le taux de mortalité est de 50% ce qui en fait un problème de santé significatif en Europe. Afin d'agir sur cette complication une meilleure connaissance de la physiopathologie de la LST est nécessaire pour permettre un ciblage plus efficace.

C'est dans ce contexte qu'a été mis en place le programme européen PRESTIGE (PREvention of Late Stent Thrombosis by an Inderdisciplinary global European effort) visant à améliorer la prévention et la détection des LST en développant de nouvelles stratégies qui auraient pour but d'éviter la formation de thrombus sans pour autant augmenter le risque de saignement. Pour cela, plusieurs laboratoires et industriels européens ont travaillé ensemble pour une approche multidisciplinaire, regroupant ainsi des spécialistes dans les différents domaines.

Les objectifs ont été divisés en 4 *work package* (WP). Le WP1 a pour objectif de définir des mécanismes aboutissant à la LST. Le WP2 a pour but d'utiliser la bio-ingénierie pour développer de nouvelles approches pour réduire les risques de thrombose de stents. Le WP3 vise à mettre au point de nouvelles techniques d'imagerie pour cibler et suivre le processus thrombotique après la pose d'un stent. Le WP4 consiste en une caractérisation multimodale des patients avec une LST.

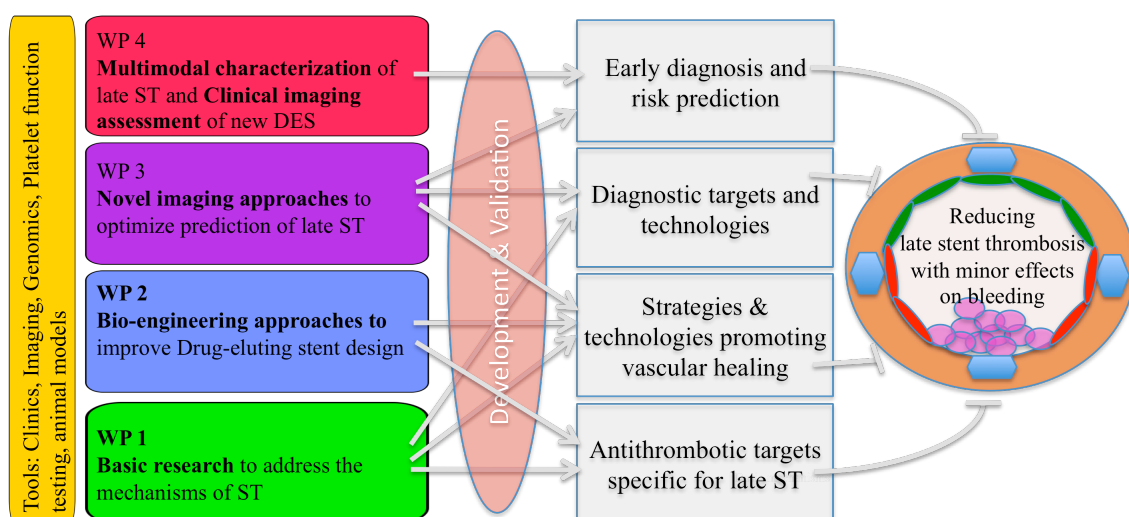


Figure 31 : Objectifs généraux de PRESTIGE

Plus précisément les objectifs du WP2 sont de modifier ou de mettre au point de nouveaux DES réduisant les risques de LST tout en minimisant les saignements. Ces stents doivent améliorer la réparation vasculaire et la réendothélialisation après implantation d'un DES, agir sur les interactions avec les plaquettes en utilisant un substrat identifié et développé dans le WP1 et de réguler les voies de la coagulation.

C'est dans ce programme européen et le WP2 que s'inscrit le travail présenté ci-après. Les objectifs de cette thèse ont été de poursuivre les travaux sur les dextrane-PBMA afin de valider leurs utilisations comme revêtement de stent.

CHAPITRE

2

PARTIE EXPÉRIMENTALE

1. Cadre et objectifs

Ce travail fait donc suite à la mise au point du copolymère de dextrane-PBMA par Mohammed Derkaoui. Plus qu'une simple analyse ou preuve de concept, nous avons choisi de nous placer dans une démarche de développement de produit. Même s'il s'agit de produits expérimentaux, l'un des objectifs sous-jacents était d'optimiser le choix des tests afin de remplir les conditions réglementaires pour faciliter la validation de certaines étapes permettant d'arriver à un éventuel stade clinique.

Dans un premier temps, la synthèse a dû être optimisée afin d'obtenir des quantités compatibles avec l'évaluation et le copolymère a dû être mis en forme afin de procéder aux différentes expériences. En effet, la durée et les rendements obtenus avec la synthèse décrite dans la littérature n'étaient pas compatibles avec de larges études. Des caractérisations physico-chimiques ont été réalisées : vérification du greffage par analyse infra-rouge à transformée de Fourier, quantification de l'hydrophobicité par mesure d'angle de contact et résistance sous flux. Puis, les copolymères obtenus ont été évalués *in vitro* : 1/ quantification de l'adhésion bactérienne, 2/ évaluation de l'hémocompatibilité par mesure de l'adhésion plaquettaire et, d'un point de vue plus large sur la coagulation, par test de génération de thrombine, 3/ prolifération et adhésion de cellules circulantes. Un modèle de délivrance de principe actif *ex vivo* par le copolymère a également été mis au point. Enfin le matériau a été évalué *in vivo* en implantation intramusculaire et *in situ* chez le rat puis dans un modèle pathologique chez le lapin (Figure 32).

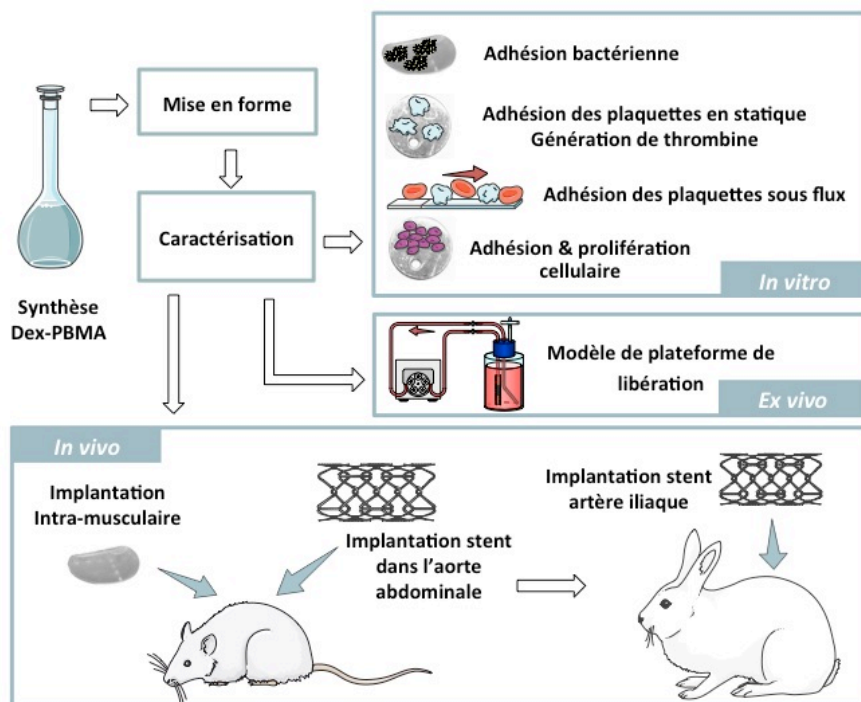


Figure 32 : Schéma de la stratégie de l'étude

2. Matériels et Méthodes

2.1. Synthèses et mise en forme des polymères

2.1.1. Matériel

2.1.1.1. Les amorceurs

Le **L'α,α-azobisisobutyronitrile (AIBN)** (Acros) (M = 146.21 g/mol), pur à 99%, est purifié par solubilisation et recristallisation. Pour cela, l'AIBN est dans un premier temps solubilisé dans un mélange eau distillée/éthanol (10/90, v/v) à 30°C, la solution est ensuite filtrée et placée à 4°C pendant 24 heures. Les cristaux formés sont récupérés par filtration, séchés sous vide à 30°C et conservés à 4°C.

Le **cérium IV** est utilisé sous forme d'ammonium cérium nitrate (hexanitratocérate(IV) d'ammonium, $(\text{NH}_4)_2[\text{Ce}(\text{NO}_3)_6]$ (548.22 g/mol) (Acros), il est utilisé sans purification supplémentaire.

2.1.1.2. Les polymères

Le **butyle méthacrylate (BMA)** (Acros, France) (d = 0.896 ; M = 142.2g/mol) est pur 99%. Avant l'emploi, les inhibiteurs de polymérisation doivent être enlevés. Pour cela, 100mL de BMA sont mélangés à 10 mL d'une solution aqueuse alcaline (NaOH 5%, NaCl 20%) dans une ampoule à décanter. Après avoir mélangé énergiquement et laissé décanter, on obtient 2 phases, une phase organique contenant les monomères méthacrylates et une phase aqueuse, contenant les inhibiteurs, qui est éliminée. Trois lavages de la phase organique avec 10 mL d'eau sont ensuite réalisés en suivant le même protocole. Enfin la phase organique est séchée par ajout de 2 g MgSO_4 sous agitation pendant 15 min. Les monomères de BMA récupérés par filtration sont conservés sous azotes, à 4°C et à l'abri de la lumière afin d'éviter toute polymérisation.

Le **dextrane 70kDa** (Sigma, France) est utilisé sans purification supplémentaire.

2.1.2. La synthèse des polymères

2.1.2.1. Polymérisation en masse du PBMA

Dans un ballon bi-cols de 25 mL, 0,82 g d'AIBN et 8 mL de BMA sont agités sous azote pendant 1h à 70°C. L'amas visqueux obtenu est ensuite solubilisé dans 10 mL d'acétone. Cette solution est précipitée dans 300 mL de méthanol afin de retirer l'AIBN soluble. Puis, le précipité obtenu est solubilisé dans 800 mL d'eau sous forte agitation. Ce précipité est ensuite lyophilisé puis broyé pour obtenir une poudre conservée à 20°C.

2.1.2.2. Copolymérisation du Dex-PBMA

L'obtention de la poudre de Dex-PBMA nécessite 6 étapes : le greffage, la précipitation, le lavage, une première lyophilisation, l'extraction soxhlet puis une dernière lyophilisation (Figure 34).

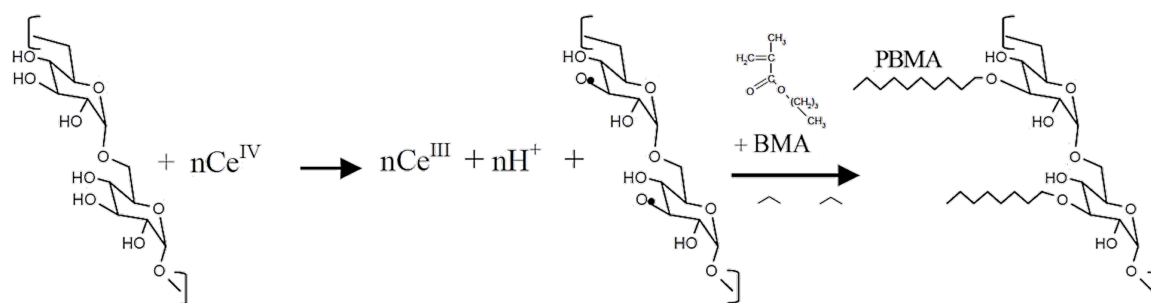


Figure 33 : Réaction de greffage (D'après Derkaoui et al.)¹³³

Dans un réacteur de 2 L, le dextrane (Tableau 12) est dissout dans 958 mL d'acide nitrique 0,2 M. Le réacteur est ensuite fermé par un couvercle à 5 cols, un pour l'agitation mécanique par pale en téflon, un pour la colonne de refroidissement, un pour l'arrivée d'azote et les deux autres fermés par des septums (Figure 34). Après 3 cycles de vide puis remplissage à l'azote du réacteur et 10 min d'agitation sous azote à 50°C, le cérium (Tableau 12) puis le BMA (Tableau 12) sont insérés dans le réacteur. La réaction de greffage (Figure 33) est arrêtée après 1 h et le pH est ajusté à 8 par ajout d'hydroxyde de sodium 10 M.

Tableau 12 : Quantité de réactifs dans la réaction de greffage du Dex-PBMA

Réactif	Dex-PBMA	Dex-PBMA'
Dextrane	0,250 g	0,7 g
BMA	2 mL	2 mL
Cérium	0,06 g	0,085 g

La suspension est ensuite concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif (Heidoph 94200) à 50°C jusqu'à un volume d'environ 50 mL (Figure 34). La suspension obtenue est ensuite versée goutte à goutte dans 300 mL de méthanol à 4°C afin d'obtenir un précipité qui est récupéré après décantation. Le produit est ensuite centrifugé, puis lavé 3 fois à l'EDTA 10⁻² M pH 4,8 et rincé 7 fois à l'eau. Le cérium est ainsi éliminé et le copolymère purifié est ensuite placé 1 h à -80°C puis placé dans le lyophilisateur (Telstar Cryodos) à -50°C et 1 mBar afin de permettre la sublimation des molécules d'eau.

Les homopolymères de PBMA sont ensuite retirés par extraction soxhlet à l'acétone pendant 12 h. Pour cela, le lyophilisat est placé dans une cartouche en cellulose, l'acétone monte sous forme de vapeur puis est refroidi dans la colonne de refroidissement (Figure 34). Il retombe alors sous forme liquide dans la cartouche et solubilise le PBMA non greffé sur le dextrane. A intervalle régulier, la cartouche est siphonnée et le cycle recommence. Le copolymère purifié est ensuite rincé à l'eau puis congelé à -80°C pendant 30 min et lyophilisé.

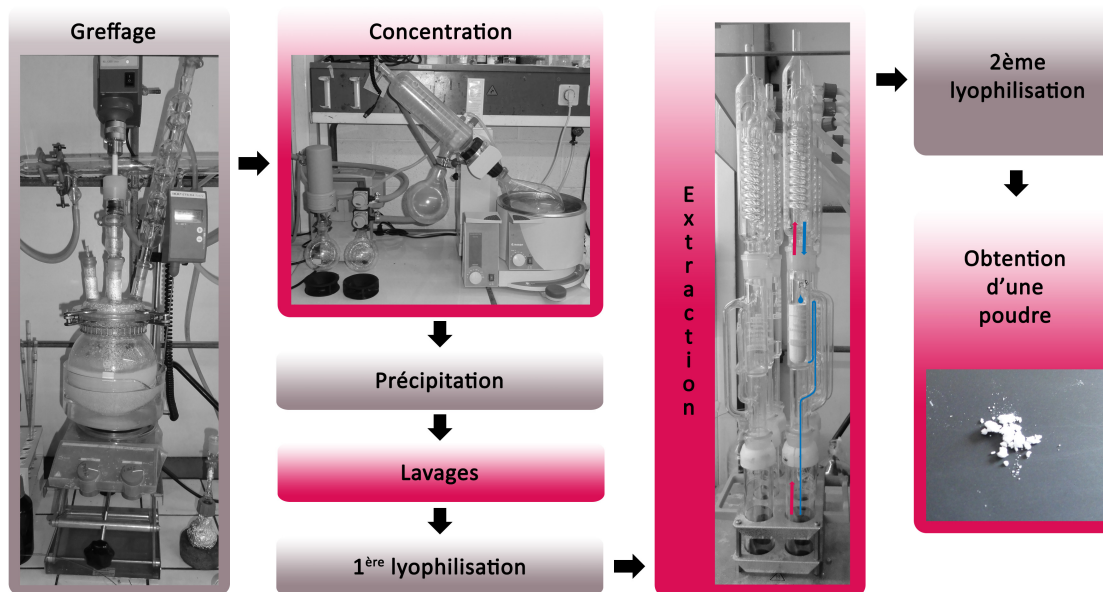


Figure 34 : Etapes de la synthèse des Dex-PBMA

2.1.3. Mise en forme des matériaux

Afin de pouvoir les évaluer les copolymères de Dextrane-PBMA sont mis sous forme de revêtements ou de films.

Tableau 13 : Récapitulatif supports et expériences

Lamelle de verre	Disque de CoCr	Stent CoCr	Film
Adhésion plaquettaire en dynamiques	Angle de contact Adhésion plaquettaire en statique Génération de thrombine Adhésion et prolifération cellulaire	Résistance sous flux Libération de principe actif Implantation AA rat Implantation iliaque lapin	Adhésion bactérienne Implantation intramusculaire

AA : Aorte abdominale

Comme le montre le Tableau 13 différentes surfaces sont recouvertes afin de mener à bien les expériences. Ainsi des lamelles de verre sont recouvertes pour la mesure de l'adhésion plaquettaire en conditions dynamiques, des disques de CoCr (L615, 5 mm de diamètre et 0,5 mm d'épaisseur) pour la mesure de l'angle de contact, de l'adhésion plaquettaire en condition statique et la génération de thrombine et des stents CoCr (différents diamètres et longueurs, Microvision, Abbott, USA) pour les mesures de résistance sous flux, libération de principe actif, implantation en aorte abdominale de rat et artère iliaque de lapin.

Les poudres de Dex-PBMA ou Dex-PBMA' sont solubilisées dans un mélange de tétrahydrofurane (THF) et eau dans un ratio de 92/8 (v/v). Respectivement 50 µL et 1000 µL de solution de copolymère à 30 % (m/v) sont distribués sur les disques en CoCr et les lamelles de verre puis évaporés 24 h à température ambiante (RT, room temperature) dans une atmosphère saturée en THF pour ralentir l'évaporation du THF et en présence de CaCl₂ pour accélérer l'évaporation de l'eau (Figure 35). Après 24 h de séchage à 37°C afin d'éliminer le THF résiduel, les disques recouverts (Dex-PBMA et Dex-PBMA' disque) ou les lamelles de verre sont stérilisés par UV et rincé au PBS avant d'être utilisés.

Pour la mesure de libération de principe actif ou l'implantation de stent dans l'artère iliaque de lapin, l'incorporation de Tacrolimus (TAC) dans le revêtement de Dex-PBMA s'est faite de la manière suivante : le Tacrolimus est dans un premier temps solubilisé dans le mélange de solvants THF/eau à 1 mg/mL puis le Dex-PBMA est solubilisé afin d'obtenir une solution de Dex-PBMA_{TAC}. Les stents et les disques (Dex-PBMA_{TAC} disque ou stent) sont ensuite recouverts dans les conditions décrites ci-dessus.

Des films sont également préparés pour l'implantation *in vivo* en intramusculaire et l'adhésion bactérienne. Pour cela, 1,5 mL de solution de copolymère à 30% par (p/v) sont dispensés dans des mini-cristallisoirs en verre de 15 mm de diamètre (fait à façon par les ateliers CLOUP). Après les étapes d'évaporation et de séchage décrites ci-dessus, les films sont démoulés, découpés avec un emporte-pièce de 8 mm de diamètre (Harris, Uni-Core), stérilisés aux UV puis lavés avec du NaCl 0,9%.

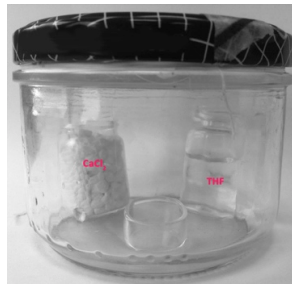


Figure 35 : Enceinte de revêtement d'un mini-cristallisoir

2.2. Caractérisation physico-chimique

2.2.1. Infrarouge à transformée de Fourier

Afin de vérifier le greffage du PBMA sur le dextrane et d'estimer les proportions de l'un et l'autre des spectres par spectroscopie infrarouge ont été réalisés. Des pastilles de 150 mg de bromure de potassium (KBr, qualité infrarouge, Fluka) contenant 1 % en masse de l'échantillon à tester sont réalisées. Les poudres sont tout d'abord séchées sous vide à 45°C pendant 6 h puis mélangées et pressées sous 15 tonnes 4 min et analysées dans la foulée. L'analyse est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier (Perkin Elmer 1600) et du logiciel Thermo Nicolet. Chaque spectre est le résultat du cumul de 32 incréments afin de diminuer les bruits de fond. Les spectres du pourcentage de transmission en fonction du nombre d'onde du rayonnement incident ont été enregistrés pour des valeurs de nombre d'ondes comprises entre 500 cm⁻¹ et 4000 cm⁻¹.

2.2.2. Mesure d'angle de contact

Des mesures d'angles de contact ont été réalisées par la méthode de la goutte sessile (DSA 10 Kruss Instrument) sur des CoCr disques, Dex-PBMA disques, Dex-PBMA' disques et Dex-PBMA_{TAC} disques. Une goutte d'eau de 1 μL est déposée sur la surface et l'angle de contact θ formé par le copolymère plan et la tangente à la goutte d'eau plus ou moins étalée est déterminé. Sur chaque échantillon, le résultat est la moyenne de 10 mesures réalisées sur différentes parties du disque.

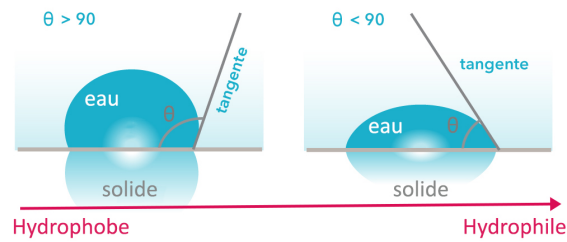


Figure 36 : Mesure d'angle de contact

2.2.3. Résistance du revêtement sous flux

La résistance du revêtement Dex-PBMA a été éprouvée *in vitro* en conditions dynamiques. Pour cela un Dex-PBMA stent de 4 mm de diamètre et 8 mm de long est déployé dans un tube en silicone de diamètre intérieur 4 mm (Versilic®) et soumis à un flux d'eau similaire au flux coronarien ($\tau=1000 \text{ s}^{-1}$) à 37°C (Figure 37). En parallèle un Dex-PBMA stent est placé dans l'eau à 37°C en condition statique. Après 7 jours, les échantillons sont métallisés avec 5 nm d'or et observés au MEB (ESEM, XL30 ESEM-FEG Philips) à 20 kV et sous Hivac.

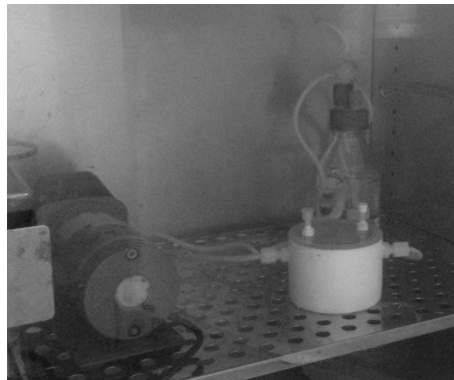


Figure 37 : Système d'évaluation de résistance sous flux

2.3. Evaluation *in vitro*

2.3.1. Adhésion bactérienne

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Graciela Pavon-Djavid et Chahrazed Ould Ahmed du département Hygiène et Sécurité de l'IUT Saint Denis, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Paris.

Le protocole d'adhésion de *Staphylococcus aureus* CIP53136 (Pasteur Institute) sur les films de Dex-PBMA, les disques de CoCr ou le collagène, contrôle positif, a été adapté d'Anagnostou *et al.*¹³⁴ Tout d'abord, les échantillons sont passivés par du SVF (Gibco) 1 h à 37°C. Après lavage avec du PBS, 1 mL de suspension de *S. aureus* à la concentration de 10^8 unités formant des colonies/mL est déposé sur chaque échantillon. Après 1 h d'incubation à 37°C, les échantillons sont lavés 3 fois avec du PBS et incubés avec 500 µL de trypsine. Les bactéries décollées sont ensuite épandues sur une gélose d'agar et cultivées une nuit. Le jour suivant, les colonies sur la gélose sont quantifiées.

2.3.2. Hémostabilité

Toutes les expériences ont été réalisées à partir de sang périphérique fraîchement prélevé provenant de donneurs sains fourni par les Etablissement Français du Sang (EFS) avec l'agrément pour l'INSERM U1148 (n°12/EFS/079).

2.3.2.1. Adhésion des plaquettes en condition statique

Lavage des plaquettes : Le sang total est collecté dans des tubes à vide de prélèvement de sang (Vacutainer™ system, Beckton Dickinson) contenant du trisodium citrate acid-citric-dextrose (ACD-A). Les tubes sont ensuite centrifugés à 200 g pendant 15 min à RT et la phase supérieure, le plasma riche en plaquette (PRP), est récupéré. Puis de l'ACD-A (1/10, v/v), de l'apyrase (2/1000, v/v) et de la prostaglandine E1 (PGE1) (1/1000, v/v) sont ajoutés au PRP et la suspension est à nouveau centrifugée à 1200 g pendant 12 min à RT. Le surnageant est jeté et le culot contenant les plaquettes est lavé deux fois avec le tampon de lavage (Tableau 14) puis suspendu à nouveau dans du tampon de réaction tel que la concentration soit de 2×10^8 plaquettes/mL. Les plaquettes sont incubées 10 min dans le tampon de réaction à RT avant utilisation.

Tableau 14 : Composition des tampons d'adhésion des plaquettes en statique

	Tampon de lavage	Tampon de réaction
pH	6,5	7,3
Acide citrique	3,6 mM	-
Glucose	0,5 mM	0,55 mM
KCl	0,5 mM	0,1 mM
MgCl ₂	0,1 mM	0,2 mM
NaCl	10,3 mM	13,7 mM
CaCl ₂	2 mM	-
BSA	3,5 mg/mL	3 mg/mL
Apyrase	2 µL/mL	-
PGE1	0,1 mM	-
HEPES	-	0,5 mM
NaH ₂ PO ₄	-	30 µM
NaHCO ₃	-	0,12 mM

Adhésion des plaquettes sur les échantillons : Les Dex-PBMA disques ou CoCr disques sont placés en triplicata dans une plaque 96 puits. Pour les contrôles positifs et négatifs, 3 puits sont recouverts de collagène I et 3 autres de BSA. Pour cela, 100 μL d'une suspension de collagène I à 10 mg/mL sont dispensés dans chaque puits et incubés 12 h à 4°C ou 150 μL de BSA 1% (m/v) en PBS sont dispensés dans chaque puits et incubés 2 h à RT.

100 μL de suspension de plaquettes lavées sont ensuite déposés sur chaque échantillon ou sur le contrôle, incubés 1 h à RT sous agitation orbitale et lavés 2 fois avec 150 μL de tampon de réaction. Puis 100 μL de solution de lyse (citrate de sodium 0,1 M, PNP 1,3 mg/mL, triton X-100 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$) sont dispensés et incubés à l'abri de la lumière 1h30 à 37°C. La réaction est arrêtée avec 25 μL de NaOH 1 M, puis 100 μL de chaque puits sont transférés dans une autre plaque et lus à 405 nm (Fluostar optima, BMG Labtech).

Afin d'observer la morphologie des plaquettes, des Dex-PBMA et CoCr disques sont fixés dans une solution de glutaraldehyde à 2,5% pendant 1 h, déshydratés dans l'éthanol, métallisés et observés au MEB (ESEM, XL30 ESEM-FEG Philips).

2.3.2.2. Adhésion des plaquettes en condition dynamique

Pour évaluer l'adhésion des plaquettes en dynamique, des chambres de flux dont le fond est une lamelle de verre recouverte de Dex-PBMA ou du témoin positif, le collagène, sont utilisées. Ces chambres sont dans un premier temps rincée avec un tampon de flux (NaCl 1,36 M ; KCl 26,8 mM ; MgCl_2 20 mM ; HEPES 0,1 M). Le sang total est collecté dans des tubes à vide de prélèvement de sang PPACK (Calbiochem), les premiers millilitres prélevés sont exclus afin d'éviter l'activation plaquettaire due à la piqure. Les plaquettes sont marquées avec 10 μM de dioc-6 (Interchim®) puis le sang est perfusé dans les chambres de flux pendant 2 min sous une force de cisaillement $\tau=1500 \text{ s}^{-1}$ à RT. Les plaquettes sont observées par microscope à contraste de phase durant toute la perfusion puis la vidéo est analysée extemporanément. La quantification de la fluorescence au cours du temps est mesurée via le logiciel imageJ en utilisant l'image à $t=0$ comme référence du zéro.

2.3.2.3. Test de génération de thrombine

Préparation des plasmas : Le sang total est collecté dans des tubes à vide de prélèvement de sang (siliconized Vacutainer™ tubes, Becton Dickinson, Meyton, France) contenant du citrate après un premier tube de purge. Les tubes sont ensuite centrifugés à 200 g pendant 15 min à RT et la phase supérieure, le PRP, est récupérée. Après une nouvelle centrifugation du sang restant à 2000 g pendant 15 min à RT, la phase supérieure, le plasma pauvre en plaquette (PPP), est récupérée. La concentration en plaquette du PRP est ajustée à $1,5 \times 10^8$ plaquettes/mL par dilution avec le PPP autologue.

Evaluation de la génération de thrombine : La génération de thrombine sur les Dex-PBMA ou CoCr disques déposés dans une plaque 96 puits en immulon 2hb (Thermoscientific®), un matériau entraînant une faible génération de thrombine et servant également de contrôle. Chaque échantillon est déposé dans 6 puits, un triplicata d'évaluation et un de calibration. Dans chaque puits, 20 µL de réactif facteur tissulaire PRP 0,5 pM, de réactif facteur tissulaire PPP LOW 1 pM, de calibrateur ou de tampon HEPES (HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, BSA 5 mg/mL, pH 7,35) sont dispensés puis, 80 µL de PRP ou PPP sont ajoutés dans les 2 h suivant le prélèvement. La plaque est ensuite insérée dans un Thrombogramme automatique calibré (Thrombinoscope®, Thrombinoscope BV, Maastricht, Pays Bas) qui distribue un réactif contenant un fluorochrome se liant à la thrombine.

Un logiciel dédié permet de calculer l'activité de la thrombine et fourni cette activité au cours du temps. Les paramètres fournis sont (Figure 38):

- Le **temps de latence** (LT, lagtime) correspondant à la durée nécessaire pour atteindre une concentration de thrombine générée de 10 nM
- Le **pic** (Peak) de thrombine correspondant à la concentration maximum atteinte durant la réaction
- Le **temps jusqu'au pic** (tPeak) correspondant au temps auquel le pic est atteint.
- L'**indice de vélocité** (VI, velocity index) $VI = \frac{Peak}{tPeak-LT}$

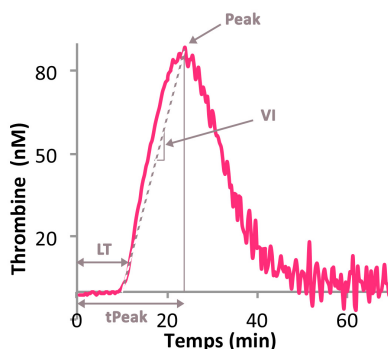


Figure 38 : Courbe type de génération de thrombine

2.3.3. Interactions avec les cellules circulantes

Cette partie a été réalisée en collaboration avec le Dr Boisson-Vidal de l'INSERM, unité mixte de recherche 1140 - Thérapeutiques innovantes en hémostase basée à la faculté de pharmacie de l'université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris.

2.3.3.1. Isolation, culture et préparation des cellules

Cellules endothéliales : Des cellules endothéliales formant des colonies (ECFC, endothelial colony-forming cells) sont isolées de sang de cordon humain après consentement de la mère approuvé par le comité éthique de l'hôpital d'Instruction des Armées de Begin (France) (autorisation n°201008043234797), le protocole étant conforme à la déontologie de la déclaration d'Helsinki.

Les ECFC sont cultivées dans l'EGM2 et caractérisées comme décrit précédemment par Zemani *et al.*¹³⁵. La présence de corps de Weibel-Palade, combinant l'expression des

marqueurs endothéliaux (CD31, KDR, Tie-2, CD144) et la double positivité – par incorporation des Dil-AcLDL et la liaison avec la BS-1 lectine – confirme le phénotype endothélial des ECFC obtenues. Les ECFC n'expriment pas les marqueurs leucomonocytiques tel que CD45 et CD14. L'expression des antigènes de la surface des lignées endothéliales a été analysée par FACS (Fluorescence-activated cell sorting, FACS Calibur, Becton Dickinson)¹³⁵. Les cellules sont utilisées avant 30 jours.

Cellules souches mésenchymateuses : Les cellules souches mésenchymateuses (MSC, mesenchymal stem cell) sont isolées de la moelle osseuse humaine obtenue après un consentement éclairé et approuvé par la déontologie (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France).

Les MSC ont été collectées via un gradient de Ficoll et cultivées dans du MEM- α (Minimum Essential Medium- α , Invitrogen, Cergy Pontoise, France) suppléé par 10% de sérum de veau foetal (SVF, HyClone, Logan, UT), 2 mM de Glutamax-I (Invitrogen), 1 ng/mL de FGF2 (R&D Systems, Lille, France) et 1 % d'antibiotique/antimitotique (Invitrogen). Les MSC de sujets ayant une sclérose systémique ainsi obtenues expriment le récepteur II de TGF β (transforming growth factor β).¹³⁶ Les cellules sont utilisées entre les passages 4 et 7.

Préparation des cellules : La veille de l'expérience, les ECFC ou MSC sont synchronisées pendant 18 h par remplacement du milieu de culture respectivement par de l'EBM2, 2,5 % SVF ou MEM Glutamax. Le jour même les cellules sont lavées puis détachées avec de l'acutase (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et re-suspendues dans le milieu approprié.

Dans une plaque 96 puits, des Dex-PBMA ou CoCr disques sont déposés en triplicata. Trois puits sont recouverts de gélatine, témoin positif, par un dépôt de 20 μ L d'une solution à 0,2 % de gélatine pendant 20 min à RT. Tous les échantillons sont passivés par 50 μ L de SVF incubés 20 min à 37°C.

2.3.3.2. Adhésion et prolifération

Adhésion cellulaire : Les ECFC ou MSN sontensemencées sur les disques à 25 000 cellules/cm² dans le milieu approprié. Les cellules sont ensuite incubées 20 min ou 2 h à 37°C dans 5 % de CO₂ et un incubateur humidifié. Après lavage des disques avec du PBS afin d'enlever les cellules n'ayant pas adhéré, la quantification des cellules adhérentes est réalisée avec du PNP (Sigma), comme expliqué dans l'adhésion des plaquettes en statique (cf. page 62).

Prolifération cellulaire : Les ECFC ou MSN sontensemencées sur les disques à 15 000 cellules/cm² dans le milieu approprié. Les cellules sont ensuite incubées 3 ou 4 jours à 37°C dans 5% de CO₂ et un incubateur humidifié. Le 3^{ème} ou le 4^{ème} jour les puits sont lavés puis le nombre de cellules est quantifié par le PNP (cf. page 62).

Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle gélatine. Tous les tests ont été réalisés trois fois en triplicata, les valeurs présentées sont la moyenne plus ou moins l'erreur standard.

2.4. Délivrance d'un principe actif *ex vivo*

Cette partie a été réalisée en collaboration avec Diego Velasquez lors de son stage de Master 2 chimie, ingénierie de la santé, biomatériaux à l'Université Paris 13.

2.4.1. Mise au point du système

Un système de perfusion *ex vivo* a été mis au point afin d'étudier la capacité du Dex-PBMA de libérer une molécule modèle, le tacrolimus. Le milieu de perfusion utilisé est du DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium, Invitrogen) suppléé avec 2 mM de bicarbonate de sodium L-glutamine (Invitrogen), 10 mL/M de pénicilline/streptomycine (Gibco) et 10 % de SVF (Gibco). Une artère stentée est introduite dans une bouteille contenant du milieu de perfusion, reliée à une pompe péristaltique (MasterflexL/S) et maintenue à 37°C.

Un flux similaire au flux physiologique ($\tau=1000 \text{ s}^{-1}$) est appliqué et un filtre stérile de 0,2 μm permet les échanges de gaz (Figure 39).

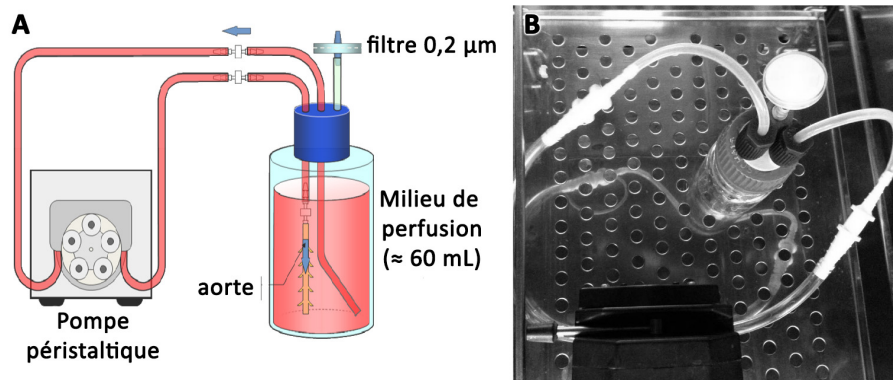


Figure 39 : Système de perfusion *ex vivo*

A – Schéma du montage B – Phot du montage dans l'étuve

2.4.2. Dosage du TAC libéré

Les artères sont prélevées sur des rats Wistar (CERJ, France) de 8 semaines pesant 200 à 250 g et coupées en segment de 5 à 7 cm de long. Un Dex-PBMA ou Dex-PBMA_{TAC} stent de 2,5 mm de diamètre est ensuite déployé à l'intérieur des segments d'artère puis placé dans le système de perfusion. Tous les jours pendant 6 jours, 1/500^{ème} du milieu circulant est prélevé.

Un test cytométrique spécifique a été développé pour quantifier la concentration en TAC libéré dans le milieu par CBA (Cytometric Bead Array). Un anticorps de polyclonal de mouton anti-TAC (New Biotech) est lié de manière covalente à une bille fluorescente de couleur identifiée (BDTM Cytometric Bead Array) (Figure 40). Ce greffage est contrôlé avant l'essai par une incubation des billes avec un anticorps secondaire fluorescent (Rabbit anti-Sheep-FITC, Pierce). Afin de déterminer la concentration de TAC, les prélèvements de milieux sont mélangés avec les billes greffées et incubés 2 h à RT à l'abri de la lumière. Le TAC interagit avec l'anticorps primaire et la quantité de tacrolimus fixée est mise en évidence par un anticorps secondaire biotynilé (HyTest LTD)

(Figure 40). Après lavage, Les billes sont incubées 15 min à RT avec la streptavidine phycoérythrine (BD Bioscience) à l'abri de la lumière (Figure 40). La lecture de la fluorescence à 485 nm est ensuite réalisée dans un FACSArray (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). Des courbes d'étalonnages sont réalisées pour des concentrations en TAC de 48 à 25000 pg/mL.

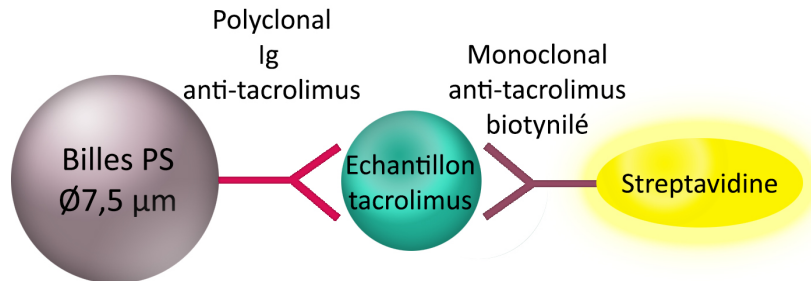


Figure 40 : Dosage du tacrolimus

2.5. Evaluation *in vivo*

Toutes les mesures et dispositions relatives au bien-être animal formulées par l'union européenne ont été respectées, l'animalerie de l'INSERM U1148 a l'agrément n°7518-03, 2005. Les protocoles utilisés ont été approuvés par le comité éthique, saisine n° 75-214 du Ministère de l'agriculture française.

2.5.1. Implantation chez le rat

2.5.1.1. Films en intra musculaire

Douze rats Wistar mâles de 9 semaines (wi/wi, CERJ, France) ont été utilisés pour cette étude. Pendant toute l'intervention, les rats ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale de Pentobarbital (0.1 % v/p).

L'évaluation de la réaction à corps étranger a dans un premier temps été évaluée par implantation intra-musculaire. Des Dex-PBMA et Dex-PBMA' films sont implantés dans la paroi abdominale des rats. Ils sont explantés après 7, 15 et 30 jours.

2.5.1.2. Stents en intra aortique

Six rats Wistar mâle de 11 semaines (CERJ, France) ont reçu un régime standard et ont reçu de l'aspirine dans leur eau (1 mg/mL) 72 h avant implantation et jusqu'au sacrifice. Pendant toute l'intervention, les rats ont été anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital (0.1 % v/p). Des stents de 2,25 mm de diamètre et 8 mm de long ont été implantés dans l'aorte abdominale via un abord direct par laparotomie. Afin de préserver la paroi artérielle, un introducteur 4F, dont la valve a été coupée, a été introduit en premier lieu. Puis, le stent a été mis en place et l'introducteur a été retiré. Le ballonnet a ensuite été gonflé déployant ainsi le stent. Après un lavage de l'aorte avec 200 U d'héparine, les rats ont été suturés en 3 temps (aorte, muscle, peau). Une angiographie a été réalisée à 30 jours pour s'assurer que le stent était toujours en place et que l'artère était toujours perméable immédiatement suivi par le sacrifice.

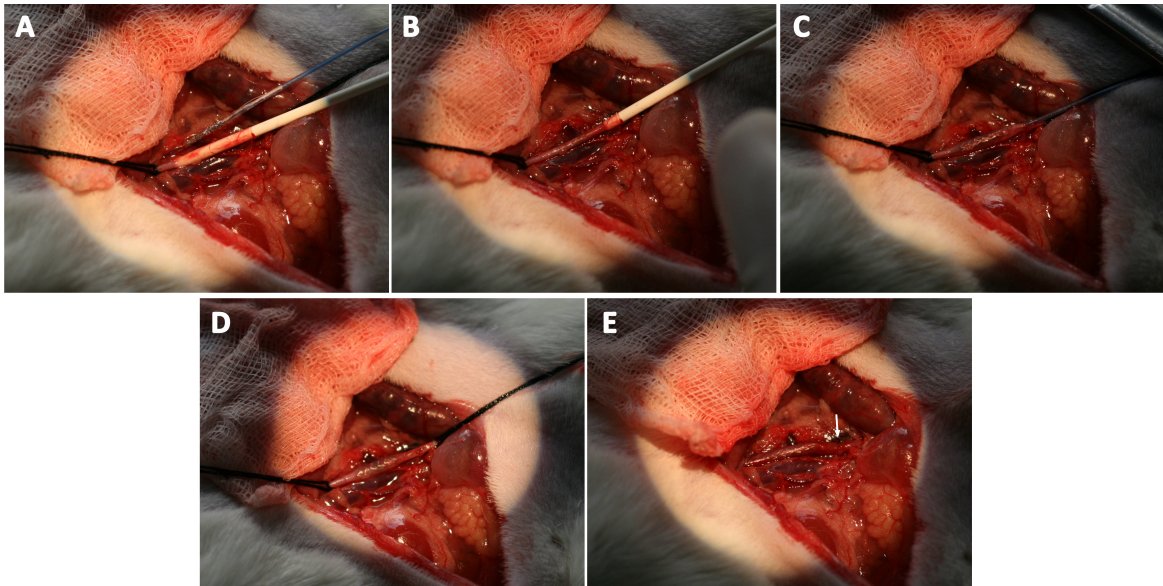


Figure 41 : Protocole d'implantation d'un stent dans l'aorte abdominale du rat

A – L'aorte abdominale est clampée par suture au fil 4/0, un introducteur 4F est introduit via une incision distale dans l'aorte afin de protéger la paroi artérielle. B – Le stent est mis en place et l'introducteur est retiré. C – Le ballonnet est gonflé et le stent se déploie. D – Le ballonnet est retiré. E – Le point d'introduction aortique est suturé (flèche) puis l'aorte est déclampée et le sang circule à nouveau.

2.5.2. Modèle de resténose chez le lapin

Le protocole a été adapté de Feldman *et al.*¹³⁷ Trois lapins blancs neozélandais, de 3,5 à 4,7 kg, ont été nourris avec de la nourriture enrichie à 0,3 % en cholestérol 21 jours avant l'intervention et jusqu'au sacrifice. Les animaux sont anesthésiés avec de la kétamine 500 U, de la xylazine et du vetranquil (14/8/4, v/v). Un introducteur de 5F est posé dans la carotide gauche, 1000 U d'héparine sont injectés et 1 mL de sang est prélevé sur seringue héparinée. Puis un guide est acheminé jusqu'à l'une des artères iliaques et une angioplastie est réalisée par 3 inflations de 1 min à 8 atm par un ballon de 2,5 mm de diamètre et 20 mm de long. Un stent de 2,75 mm de diamètre et 8 mm de long est déployé par une inflation de 30 s à 10 atm. L'artère est élargie d'un ratio de 1,2 à 1,3 ce qui à terme favorise une hyperplasie intimale. Après 30 jours une angiographie est réalisée afin de vérifier la perméabilité des artères stentées et 1 mL de sang est prélevé sur seringue héparinée. L'animal est sacrifié et l'artère iliaque ayant reçu le stent est prélevée. Les échantillons sont ensuite inclus en résine, comme décrit pour le rat, des coupes de 10 µm sont réalisées puis colorées.

Le sang hépariné prélevé est centrifugé à 2000 g pendant 15 min, le plasma est récupéré et placé à -80°C jusqu'à analyse.

Une fois l'ensemble des lapins sacrifiés, le plasma est décongelé à RT et un test ELISA est réalisé pour doser le TNF-α (Rabbit TNF-α (Tumor necrosis factor α) ELISA Kit, Elabscience).

2.5.3. Analyse des prélèvements

2.5.3.1. Analyses histologiques

Films dans la paroi musculaire : Les explants sont fixés 48 h en paraformaldéhyde 4%, puis inclus en paraffine. Des coupes de 6 μ m sont réalisées à l'aide d'un microtome (Microm HM) à partir du milieu du film. Les coupes sont ensuite déparaffinées à l'acétone et colorées à l'hématoxyline éosine (HE) et au Naphthol AS-D Chloroacetate, marquant les estérases se trouvant dans les lignées granulocytaires.

Aortes stentées : Les aortes prélevées sont fixées 72 h en paraformaldéhyde 4% et incluse en résine d'après un protocole adapté de Rippstein *et al.*¹³⁸ Pour cela, les échantillons sont dans un premier temps desséchés par des bains successifs d'éthanol à 70 %, 95 % et 100 % à 4°C. Les échantillons sont ensuite imprégnés dans une solution (5,6 M méthylmethacrylate (Sigma) ; 2,2 M BMA ; 0,4 M méthylbenzoate (Sigma) ; 34 mM polyéthylène glycole 400 (Sigma) ; 16,5 mM benzoyle peroxyde (Merck)) pendant 72 h. Puis, les échantillons sont déposés dans un flacon en verre dans lequel un fond en résine a été coulé au préalable, et une résine est coulée autour de l'échantillon. Une solution (5,6 M méthylmethacrylate (Sigma) ; 2,2 M BMA ; 0,4 M méthylbenzoate (Sigma) ; 34 mM polyéthylène glycole 400 (Sigma) ; 34 mM benzoyle peroxyde (Merck)) est introduite dans le flacon afin de recouvrir l'échantillon. Le flacon est ensuite fermé et le mélange est soumis à un bullage d'azote pendant 5 min avant d'introduire 5,45x10⁻² mM de N, N-diméthyle-p-toluidine. Après environ 72h la polymérisation est terminée, le flacon est cassé et le bloc est dégrossi puis des coupes (Microm HM) de 10 μ m d'épaisseur sont réalisées à partir du milieu de l'artère.

Les lames sont ensuite dépolymérisées dans des bains de 2-méthoxyéthyl acétate puis colorées à l'HE ou immuno-marquées avec l'alpha actine, le RECA ou le CD-68 respectivement spécifique des cellules musculaires lisses, cellules endothéliales et macrophages.

2.5.3.2. Analyses morphologiques

Les lames histologiques sont scannées par le Nanozoomer (Hamamatsu) et l'image digitale est analysée avec logiciel NDV view (Hamamatsu) selon le protocole ci-dessous :

Pour les films dans la paroi musculaire : Sur 3 coupes colorées à l'HE par rat, l'épaisseur de la chape cellulaire est mesurée à 5 reprises.

Pour les aortes stentées : L'analyse est réalisée d'après la méthode de Feldman *et al.*¹³⁷

Différentes mesures d'aires sont réalisées sur les coupes colorées en HE (Figure 42) :

- L'aire de la lumière \mathcal{A}_L
- L'aire délimitée par la limitante élastique interne (\mathcal{A}_{LEI})
- L'aire délimitée par la limitante élastique externe (\mathcal{A}_{LEE})

On en déduit ainsi :

- L'aire de l'intima $\mathcal{A}_I = \mathcal{A}_{LEI} - \mathcal{A}_L$
- L'aire de la média $\mathcal{A}_M = \mathcal{A}_{LEE} - \mathcal{A}_{LEI}$
- Le ratio $\mathcal{A}_I/\mathcal{A}_M$

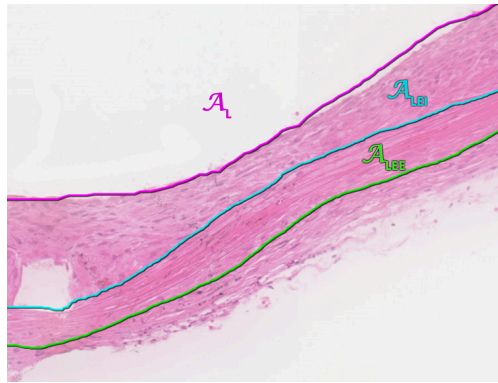


Figure 42 : Mesures des différentes aires sur une coupe HE

2.6. Statistiques

Toutes les expériences réalisées à $n \geq 3$ ont fait l'objet d'une étude statistique. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne plus ou moins l'erreur standard. Pour un nombre de groupes supérieur à 2, des tests d'analyse de la variance (ANOVA) suivis d'un post-test de Bonferroni sont utilisés pour déterminer la significativité de la différence des résultats entre les groupes, sinon un t-test est réalisé. Une valeur de $p < 0,05$ est acceptée comme statistiquement différente.

3. Résultats et discussion

Dans les travaux préalables, des proportions variables de dextrane/PBMA introduites lors de la synthèse ont été évaluées (0,125/2 ; 0,5/2 ; 0,75/2 ; p/v). Le ratio 0,125 Dextrane/2 PBMA s'est révélé être le plus efficace *in vitro* vis-à-vis de la prolifération des cellules endothéliales et de la non-prolifération des CML². Afin de vérifier que les proportions optimales étaient bien celles déjà testées, un ratio intermédiaire a été synthétisé. L'étude porte donc sur le Dex-PBMA (0,125/2) et le Dex-PBMA' (0,25/2), le premier objectif était d'en sélectionner un seul afin de l'évaluer de manière plus poussée.

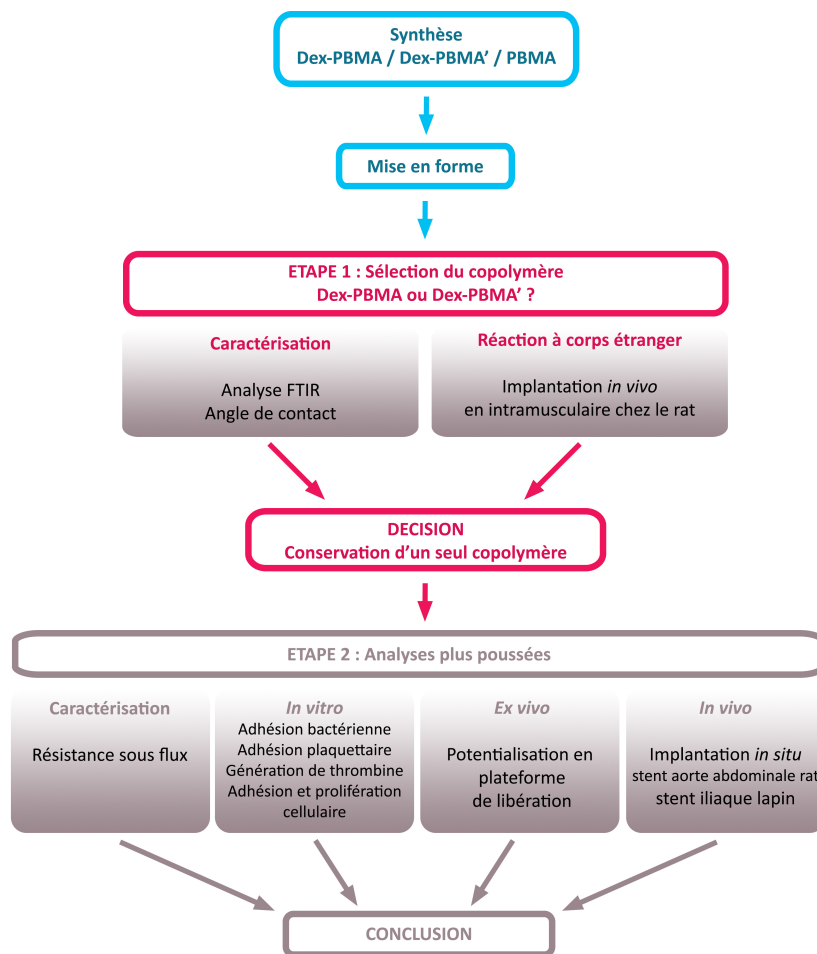


Figure 43 : Réalisation du projet

Pour cela, comme l'explique la Figure 43, après synthèse et mise en forme, le greffage et les proportions de dextrane ont été contrôlés et quantifiés par analyse infrarouge à transformée de Fourier et mesure d'angle de contact. Puis une évaluation de la réaction à corps étranger a permis de choisir l'un des deux copolymères.

L'étude du copolymère retenu a ensuite été approfondie. Sa résistance sous flux, l'adhésion des bactéries, l'hémocompatibilité, les interactions avec les cellules circulantes, sa potentialisation en plateforme de libération et son implantation sur stent revêtu chez l'animal ont été testées.

3.1. Synthèses et mise en forme des échantillons

3.1.1. PBMA

La polymérisation en masse aboutie à une fine poudre blanche. Deux synthèses, d'un rendement moyen de 59,7 %, ont été réalisées et mélangées afin d'obtenir un lot de 9,55 g suffisant pour réaliser toutes les études par la suite.

3.1.2. Dex-PBMA et Dex-PBMA'

Les synthèses aboutissent à des poudres blanches homogènes. Douze synthèses de chaque polymère ont été réalisées puis mélangées afin d'obtenir des lots homogènes. Les rendements et masse de produits obtenus sont présentés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Bilan des synthèses Dex-PBMA et Dex-PBMA'

Synthèse n°	Dex-PBMA		Dex-PBMA'	
	Masse (g)	Rendement (%)	Masse (g)	Rendement (%)
1	1,25	29,40	1,75	37,27
2	0,75	17,59	2,36	50,13
3	0,93	21,83	1,11	23,59
4	1,83	42,98	1,19	25,25
5	1,00	24,96	1,01	21,40
6	1,40	32,90	0,44	9,36
7	0,71	16,78	0,91	19,28
8	1,15	26,98	1,79	43,93
9	1,50	35,16	0,94	20,06
10	1,05	24,76	1,00	21,17
11	0,54	12,79	1,84	39,04
12	1,03	24,30	2,29	56,26
Total	13,14	25,87±8,45	16,62	30,56±14,38

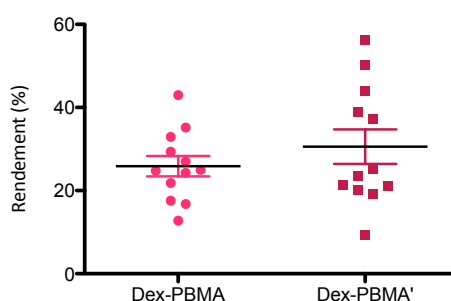


Figure 44 : Rendements des synthèses de Dex-PBMA et Dex-PBMA' (n=12, aucune différence significative)

Les 12 synthèses de Dex-PBMA ont abouti à 13,14 g et celles de Dex-PBMA' à 16,62 g, ces quantités sont suffisantes à la réalisation de l'ensemble des analyses. Le rendement moyen de la synthèse de Dex-PBMA est de 25,87 ±8,45 % tandis que celui de Dex-PBMA' est de 30,56 ±14,38 %. Du fait de grandes variabilités inter-synthèses (Figure 44), cette différence n'est pas significative.

Plusieurs modifications ont été apportées à la synthèse décrite par Derkaoui *et al.*² Le volume de synthèse a été doublé, l'agitation magnétique a été transformée en agitation mécanique plus adaptée au volume et plus reproductible. Des cycles de vide ont été insérés en début de réaction de greffage afin de réduire au mieux la quantité d'oxygène

et ainsi d'améliorer le rendement. Même si elle reste en excès, la quantité de cérium a été ajustée de manière proportionnelle à la quantité de dextrane insérée, le cérium pouvant être présent comme résidu dans la poudre finale. Ce paramètre a été contrôlé par analyses élémentaires, réalisées par l'Institut des Sciences Analytiques, et est de l'ordre de 0,1 % dans chacune des poudres obtenues. Enfin les dialyses ont été supprimées car le polymère en suspension peut être centrifugé et culotté. Le but des dialyses étaient de retirer une partie du cérium après la réaction, un dosage du cérium a donc été réalisé sur un lot ayant été dialysé et un lot ne l'ayant pas été. Aucune différence n'a été notée. Toutes ces modifications réduisent la durée de production à 7 jours contre 8 auparavant.

Ces adaptations ont permis d'améliorer la reproductibilité et de réduire le temps de production. Leurs impacts sur le rendement est difficile à évaluer par manque de références dans la littérature, cependant le rendement d'une synthèse de dextrane et méthyl-méthacrylate suivant le même protocole et dans les mêmes proportions est de l'ordre de 15 %, ¹³³ soit environ 2 fois moins qu'avec la synthèse Dex-PBMA modifiée.

3.1.3. Mise en forme

Afin de réaliser les expériences les polymères et copolymères ont été mis sous forme de films ou de revêtement.

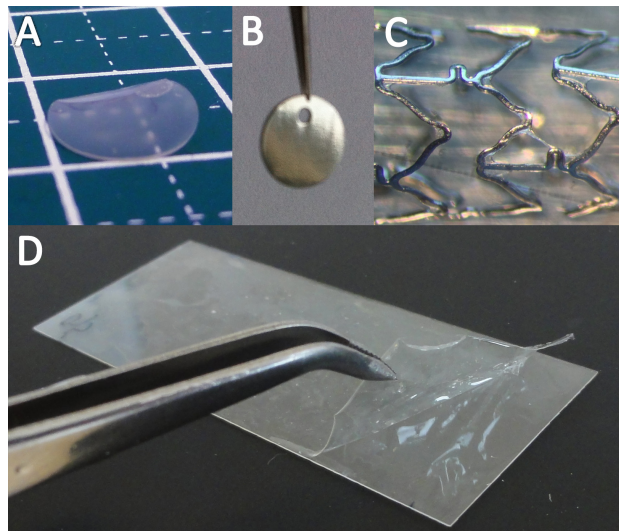


Figure 45 : Échantillon après revêtement par le Dex-PBMA

A – Film de Dex-PBMA Ø 8 mm B – Disque de CoCr recouvert de Dex-PBMA

C – Stent CoCr Ø 2,25 mm recouvert de Dex-PBMA

D – Lamelle de verre recouverte de Dex-PBMA

Les matériaux obtenus sont homogènes et transparents sans fissure apparente (Figure 45). Lorsque les disques de CoCr sont nettoyés, un film complet, monobloc de copolymère est retiré, le revêtement des disques de CoCr est donc bien uniforme et homogène. Sur les stents, quelques ponts de Dex-PBMA peuvent être observés entre des mailles ainsi que quelques petits ménisques au niveau des fortes courbures. Le petit diamètre de ces stents favorise ce phénomène de par la proximité des mailles.

Afin de réduire le nombre de ces imperfections, l'utilisation d'une solution de Dex-PBMA à plus faible concentration, donc moins visqueuse, pourrait être une piste mais une telle solution pourrait également entraîner des soucis d'homogénéité dus à l'écoulement par gravité lors du séchage et une multiplication du nombre de trempages serait nécessaire afin de conserver l'épaisseur du revêtement. Une optimisation de la technique de revêtement serait donc probablement plus judicieuse. Un revêtement par spray est envisageable. Déjà couramment utilisé dans l'industrie pour le revêtement des stents actifs, il n'est cependant pas simple à mettre en œuvre dans le cas du Dex-PBMA du fait du solvant mixte THF/eau. Il faudrait veiller minutieusement à maîtriser l'atmosphère afin d'éviter la précipitation du copolymère sur les mailles.

En résumé, cette étape préliminaire de synthèse et mise en forme des copolymères a permis d'améliorer la synthèse et de la standardiser. En effet le précédent protocole était fortement opérateur-dépendant et ne permettait d'obtenir que de faibles quantités de poudre de Dex-PBMA d'une part à cause d'un faible rendement et d'autre part du fait d'une durée de synthèse de 8 jours. Les adaptations mises en place ont permis d'atteindre des rendements de 25 % à 30 % selon les proportions de dextrane et PBMA et de réduire la durée de synthèse de 24 h. De plus les modifications de protocole apportées, notamment l'agitation mécanique par une pale, ont permis d'augmenter la reproductibilité de la synthèse. Les processus de mise en forme quant à eux permettent d'obtenir des supports adaptés aux expériences suivantes.

3.2. Etape 1 : Sélection du copolymère

3.2.1. Caractérisation

3.2.1.1. Analyse par Infra-Rouge à transformée de Fourier

Afin de vérifier le greffage et d'estimer les proportions de dextrane/PBMA sur le produit fini, les copolymères ont été analysés par FTIR.

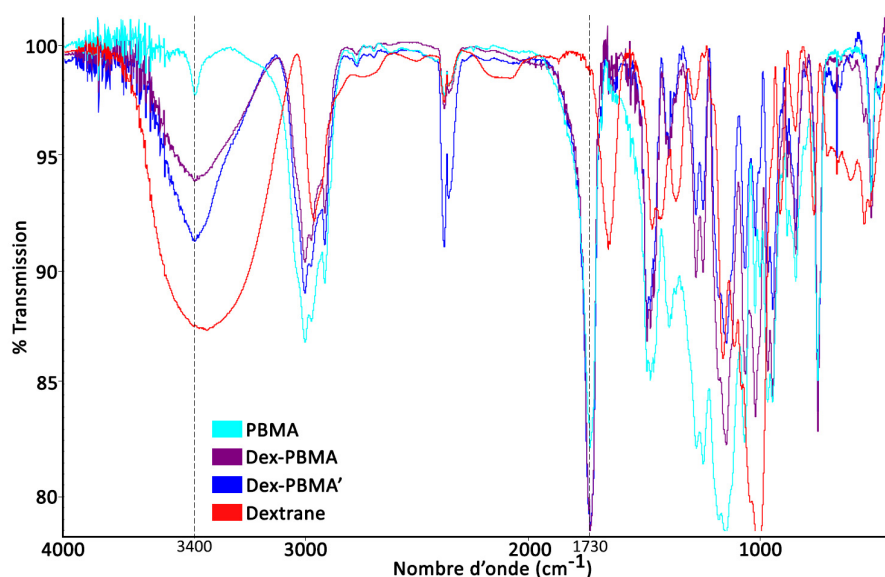


Figure 46 : Spectres FTIR du Dex-PBMA, Dex-PBMA', PBMA et dextrane

Les pics à 3400 cm⁻¹ et 1730 cm⁻¹ correspondant respectivement aux fonctions O-H et C=O sont caractéristiques du dextrane et du PBMA. L'existence conjointe de ces deux pics sur les spectres du Dex-PBMA et Dex-PBMA' confirme la présence de dextrane et de PBMA (Figure 46). Le pic à 3400 cm⁻¹ sur le PBMA correspond probablement à une pollution.

Les aires des pics OH et C=O sont respectivement proportionnelles à la concentration en dextrane et en PBMA présentes dans l'échantillon. Grâce à l'étalonnage avec la pastille de dextrane, l'évolution du rapport $A = \frac{pic(OH)_{echantillon}}{pic(OH)_{dextrane}} \times 100$ peut être corrélée à la proportion de dextrane présente dans le copolymère.

Tableau 16 : Analyse des spectres FTIR
Proportion de dextrane (A) dans le Dex-PBMA, le Dex-PBMA' ou le dextrane
(n=3, aucune différence significative)

	Dextrane	Dex-PBMA	Dex-PBMA'
A (%)	100	19 ±0,5	20,9 ±4,1

Malgré un facteur 2 entre le Dex-PBMA et le Dex-PBMA' concernant les proportions de dextrane introduites $\frac{m_{Dextrane}}{m_{PBMA} + m_{Dextrane}}$, 5,6 % vs 11 %, après la réaction de greffage les proportions de dextrane dans les poudres obtenues sont très proches 19 ±0,5 % vs 20,9 ±4,1 % et non significativement différentes (Tableau 16).

Dans les travaux précédents, le copolymère de même composition que le Dex-PBMA était présenté comme contenant 11 % de dextrane² soit une différence de 8 % avec les résultats ci-dessus. Cette différence pourrait s'expliquer par la méthode, en effet l'analyse des spectres FTIR est une technique semi-quantitative comme l'explique McCool *et al.*¹³⁹ il s'agit d'une estimation.

3.2.1.2. Angle de contact

Le dextrane est très hydrophile tandis que le PBMA est hydrophobe. La balance hydrophile/hydrophobe des copolymères Dex-PBMA et Dex-PBMA' a été évaluée ainsi que l'impact de l'insertion de tacrolimus, le tout a été comparé au CoCr nu.

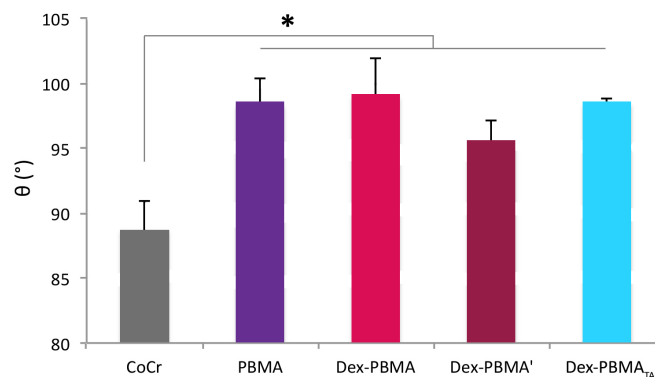


Figure 47 : Angle de contact
Entre une goutte d'eau pure et une surface plane de Dex-PBMA, Dex-PBMA',
*Dex-PBMA_{TAC}, CoCr et PBMA (n=10, * p<0,05)*

Aucune différence significative n'a été notée entre les polymères (PBMA, Dex-PBMA, Dex-PBMA' et Dex-PBMA_{TAC}). Le CoCr quant à lui est moins hydrophobe que les polymères.

Les angles de contact θ sur le PBMA sont comparables aux résultats antérieurs présentés par Derkaoui *et al.*² (99° vs 98 ± 2°) tandis qu'avec le Dex-PBMA une différence conséquente de 20° est constatée (80° vs 99 ± 3°). La différence de support, des films de Dex-PBMA dans le premier cas et des disques recouverts de Dex-PBMA, peut être une hypothèse expliquant cette différence.

La mouillabilité d'une surface influe sur plusieurs paramètres biologiques tels l'adsorption des protéines, l'adhésion et la prolifération cellulaire^{140,141} ou l'adhésion bactérienne.¹⁴² Sur une surface très hydrophobe les composants de la matrices extracellulaires vont s'adsorbés dans une configuration rigide qui rend certains de leur sites moins accessibles, ce qui limite l'adhésion cellulaire. Une surface très hydrophile ne permet pas non plus l'adhésion cellulaire car les forces d'interactions entre la cellule et la surface sont trop faibles.¹⁴⁰ Certaines études ont montré qu'un angle de contact θ de 50-60° donnait les meilleurs résultats du point de vue de la prolifération des fibroblastes.¹⁴¹

Sous forme de revêtement le Dex-PBMA est donc une surface hydrophobe présentant un angle de contact semblable à celui du PBMA seul et supérieur à 90°. Cette valeur élevée ne semble donc pas être optimale. Un matériau plus hydrophile permettrait une meilleure réparation tissulaire^{140,141} cependant l'impact sur les autres propriétés serait probablement non négligeable.

3.2.2. Réaction à corps étranger

Afin d'avoir une première idée de la réaction *in vivo* au Dextrane-PBMA des Dex-PBMA et Dex-PBMA' films ont été implantés dans la paroi abdominale de rat. Le choix de l'implantation intramusculaire plutôt que sous cutanée, comme conseillé par la norme ISO 10993, est justifié par la vascularisation plus importante des muscles. En effet l'objectif étant d'utiliser les Dex-PBMA ou Dex-PBMA' comme revêtement de stent il est plus pertinent de les évaluer dans un milieu plus au contact du sang.

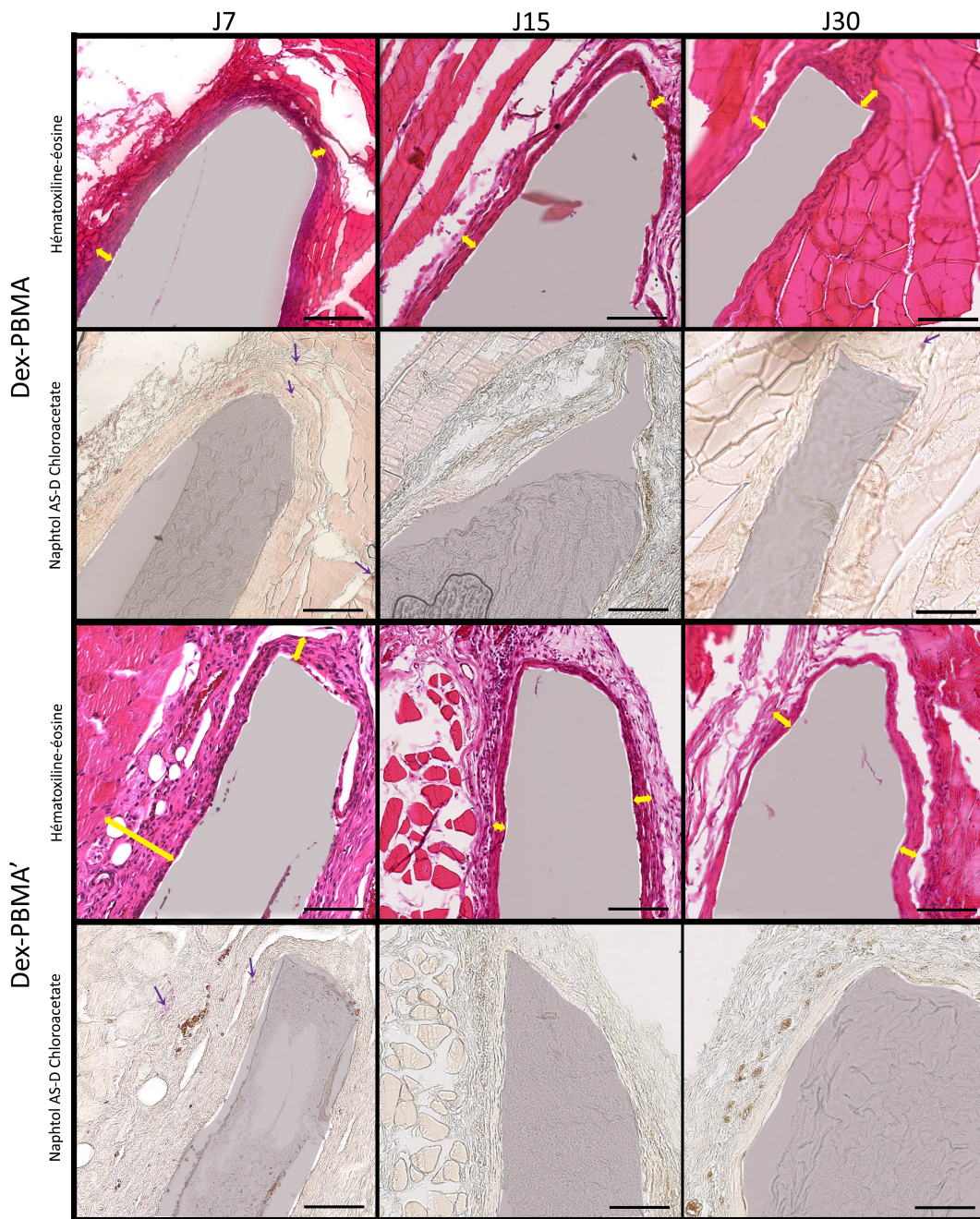


Figure 48 : Analyses histologiques des films de Dex-PBMA et Dex-PBMA' implantés en intramusculaire après 7,15 et 30 jours. Echelle 100 µm.

Colorations Hématoxiline-éosine et Naphtol AS-D Chloroacetate marquant les estérases (flèches violettes). Les doubles flèches jaunes indiquent l'épaisseur de la chape cellulaire se formant autour des films dont l'emplacement est indiqué par les zones beiges.

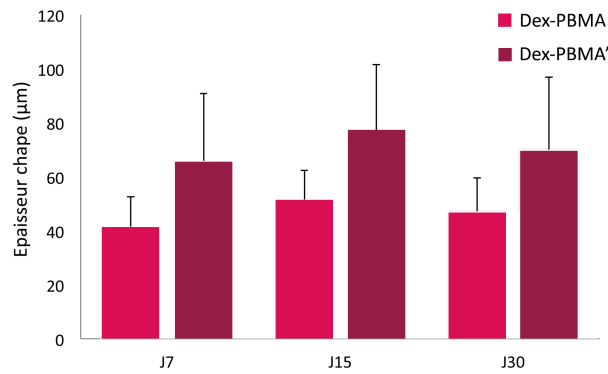


Figure 49 : Evolution de l'épaisseur de la chape cellulaire se formant autour des films de Dex-PBMA et Dex-PBMA' après implantation en intramusculaire chez le rat à 7, 15 et 30 jours. (n=3, aucune différence significative)

Sur la Figure 48, les zones grisées représentent la place des films de copolymères. Ces derniers se décollent dans les colorations HE car les lames subissent deux fois plus de bains de toluène et le montage se fait à l'Eukit tandis que sur les colorations de naphthol AS-D chloroacetate, le montage est aqueux et les films sont encore en partie présents.

Comme le montre les colorations HE, les réactions au Dex-PBMA et Dex-PBMA' sont semblables (Figure 48). Une chape cellulaire se forme autour des films dès 7 jours, délimitée par les double flèches jaunes (Figure 48) et n'évolue pas au cours du temps ($40,46 \pm 12,10 \mu\text{m}$ vs $47,11 \pm 12,43 \mu\text{m}$ respectivement à J7 et J30 sur le Dex-PBMA) (Figure 49). La mesure de l'épaisseur de cette chape ne montre également aucune différence significative entre le Dex-PBMA et le Dex-PBMA' (respectivement $47,11 \pm 12,43 \mu\text{m}$ vs $70,02 \pm 26,64 \mu\text{m}$ à J30) (Figure 49). Le marquage en rose des estérases - spécifiques des granulocytes - au Naphthol AS-D Chloroacetate, mis en évidence par les flèches violettes (Figure 48), illustre l'absence d'inflammation chronique.

L'introduction d'un corps exogène dans l'organisme déclenche une réaction inflammatoire plus ou moins importante qui peut aboutir à l'encapsulation du corps étranger par une capsule fibreuse et la formation de cellules géantes à corps étranger.¹²⁴ L'implantation donne lieu à une première phase inflammatoire aiguë qui peut se transformer en phase inflammatoire chronique aboutissant à la formation de granulomes où prolifèrent les cellules fibroblastiques qui forment par la suite une capsule fibreuse. En parallèle, l'adhésion de monocytes peut entraîner un recrutement de macrophages qui en se différenciant se transforment en cellule géante.¹⁴³ D'autres études visant à évaluer de nouveaux biomatériaux ou revêtements ont mesurées l'épaisseur de la chape cellulaire entourant un matériau implanté. Les épaisseurs obtenues vont de 60 à 120 μm pour des hydrogels à base de PLGA avec ou sans PEG sebacid acid diacrylate,¹⁴⁴ à 600 μm à 1500 μm pour des pastilles de silicone recouvertes de PLGA ou d'un inhibiteur de TNF- β .¹⁴⁵ D'autre part, l'injection d'une solution anti-adhésive peut permettre la réduction de cette formation cellulaire $668,10 \pm 275,12 \mu\text{m}$ à

$356,97 \pm 112,11 \mu\text{m}^{146}$. Ces chapes cellulaires sont donc plus épaisses que celles obtenues sur le Dex-PBMA. Cependant ces épaisseurs ne sont pas directement comparables à celles sur les dextrane-PBMA. En effet même si les valeurs sont toutes mesurées 30 jours après implantation, les sites d'implantations sont différents - dans le haut ou bas du dos du rat sous la panicule ou en sous-cutanée - ainsi que la taille des implants testés - respectivement des pastilles $\varnothing 10$ mm épaisseur 2 mm, $\varnothing 2$ cm épaisseur 1,5 mm ou des films rectangulaires 10x10x2 mm³.

Les copolymères de Dextrane-PBMA ne déclenchent donc pas de réaction inflammatoire marquée et semblent déclencher une réponse à corps étranger mineure. Aucune réaction inflammatoire chronique, ni macrophages, ni cellules géantes à corps étranger n'ont été observés. La chape cellulaire est principalement composée de collagène et est probablement fibreuse. De plus, son épaisseur raisonnable n'isole pas le matériau du reste de l'organisme et permet d'envisager l'utilisation des dextrane-PBMA comme plateforme de libération. Au vu des résultats, nous pouvons espérer que les principes actifs soient donc disponibles au niveau du tissu cible.

A ce stade, deux compositions de copolymère ont été comparées. Elles ne différaient que par les proportions de dextrane et PBMA introduites lors de la synthèse, 11:89 m/m pour le Dex-PBMA et 21:79 m/m pour le Dex-PBMA'. Ces copolymères ont été caractérisés par infra-rouge à transformée de Fourier, mesure d'angle de contact ainsi que par implantation intra-musculaire chez le rat. Face à l'absence de différences significatives entre le Dex-PBMA et le Dex-PBMA' dans l'ensemble des analyses aussi bien physico-chimiques que biologiques, il a été décidé de poursuivre l'étude avec un unique copolymère, le Dex-PBMA. Ce dernier a été sélectionné car les études préalables fournissaient déjà de nombreuses informations.

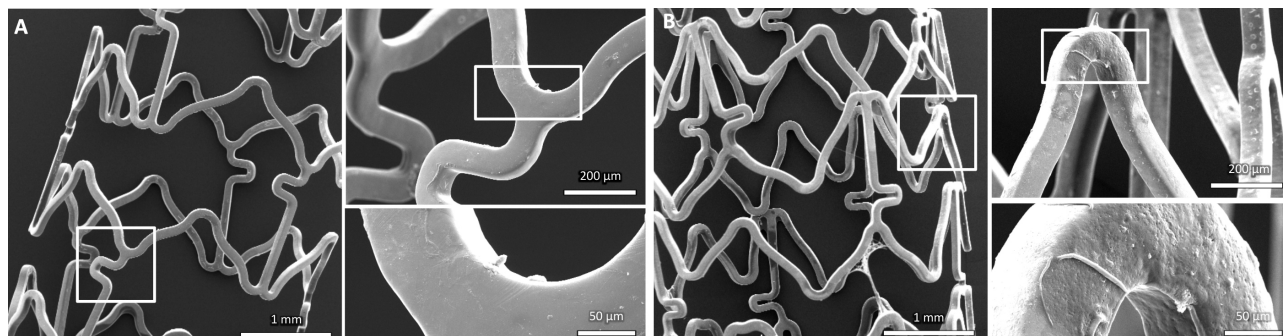
3.3. Etape 2 : Analyse du revêtement Dex-PBMA

Une fois sélectionné, l'objectif était d'évaluer la capacité du Dex-PBMA à recouvrir un stent et à étudier non seulement la résistance du revêtement mais aussi son évaluation biologique vis-à-vis des bactéries, de la coagulation, des cellules circulantes et de la tolérance et l'impact *in vivo* sur la resténose.

3.3.1. Caractérisations du copolymère retenu

3.3.1.1. Résistance sous flux

Afin de s'assurer que le revêtement ne s'altère pas une fois sous flux des stents Dex-PBMA ont été placés en conditions dynamiques à $\tau=1000 \text{ s}^{-1}$.



*Figure 50 : MEB de stents recouverts de Dex-PBMA ayant passé 7 jours dans l'eau
A-En conditions statiques B-En conditions dynamiques $\tau=1000 \text{ s}^{-1}$
Les stents ont été déployés, recouverts par trempage, sertis manuellement sur un ballonnet puis déployés à nouveau*

La Figure 50A montre des images MEB du stent Dex-PBMA contrôle, déployé après sertissage sur un ballonnet, ayant passé 7 jours dans l'eau à 37°C en condition statique. Un revêtement uniforme sans craquelure, ni crête ni pont entre les mailles est observé. Cela confirme que le Dex-PBMA permet de recouvrir un stent de manière uniforme, résiste à un sertissage sur le ballonnet et à un redéploiement.

L'observation de DES commercialisés ont montrés qu'après déploiement dans de l'eau déionisée à 25°C et observation MEB immédiate 4,6 % à 100 % des revêtements étaient endommagés par des crêtes, des fissures, des décollements, des délaminages ou des ponts entre les mailles.¹⁴⁷ Après 7 jours à 37°C sous flux mimant le débit sanguin coronarien, ni craquelures ni déchirures ne sont apparues au niveau du revêtement Dex-PBMA (Figure 50B). Aucun manque de matière dû à un délaminage n'est apparent mais quelques aspérités sont observables en microscopie électronique, probablement dues à un gonflement du polymère ou à la formation d'un léger dépôt (Figure 50B).

Nous pouvons donc considérer, en comparant avec les aspects microscopiques des stents commerciaux^{107,108} que cette étape cruciale dans la suite de notre travail, a été franchie avec succès au vu de nos résultats.

D'une manière générale, les divers travaux dans ce domaine évaluent les revêtements en milieu aqueux déionisé.¹⁴⁷ Dans cette étude nous avons choisi dans un premier temps de faire de même afin de limiter la présence d'éléments tels les sels qui auraient pu créer un dépôt sur le revêtement et donc complexifier l'analyse des résultats. En ce qui concerne les études de résistance de surface des matériaux, les données de la littérature sont variables. Les matériaux peuvent être placés sous agitation, tels Shaulov *et al.*¹⁴⁸ pour leur stent (100tr/min) ou sous flux tangentiels.¹⁴⁹ En ce qui nous concerne, nous

avons choisi de nous rapprocher le plus possible des conditions physiologiques en se plaçant à la fois à 37°C et en appliquant des contraintes mécaniques tangentielles mimant ainsi l'écoulement physiologique dans une artère. Néanmoins, ce test pourrait être optimisé en augmentant les forces tangentielles. Pour cela, nous proposons d'utiliser soit un milieu comme enrichi en albumine, protéine majoritaire du sang, qui permettrait d'augmenter la viscosité du sang soit du plasma. L'inconvénient de ce dernier est le risque de contamination au bout de 7 jours sous flux. Cette durée est relativement courte. Cependant, des études réalisées *in vivo* montrent que le stent est rapidement recouvert d'un dépôt protéique dès son introduction dans le vaisseau sanguin¹²⁴ puis de tissu et d'une couche de cellules endothéliales plus ou moins complète après 10 à 14 jours d'implantation.^{102,106} Ainsi, une fois recouvert, le revêtement ne subit plus les mêmes efforts. Néanmoins, la possibilité de malposition ou de non congruence du stent avec la paroi peut influencer sur sa surface.¹⁵⁰ Dans ces cas des problèmes de résistance du revêtement pourraient se poser, et il serait souhaitable, en se basant sur les différents résultats *in vivo*, de prolonger cette étude au minimum entre 20 et 30 jours. Si nécessaire, des techniques pour accroître l'adhésion entre le métal du stent et le copolymère du revêtement pourraient être envisagées. Certaines solutions ont déjà été décrites basées sur l'ajout d'une couche intermédiaire ayant simplement une meilleure adhésion,⁷ greffée à la structure métallique¹⁵¹ ou nanocouplée.¹⁵²

3.3.1.2. Adhésion bactérienne

L'un des risques lors de l'implantation d'un dispositif médical est l'infection sur prothèse. L'occurrence des infections de stents est rare, Bosman *et al.* rapportent 76 cas d'infection de stents vasculaires en métal nu dont seulement 29 concernent des stents coronariens.¹⁴ Toutefois, cette complication conduit à une ré-intervention en urgence et est associée à un haut taux de mortalité - 38,9% pour les stents coronariens¹⁴ - qui justifie l'importance de l'évaluation de l'adhésion bactérienne sur le copolymère. *Staphylococcus aureus* étant la bactérie majoritairement mis en cause lors de cette complication,¹⁴ elle a été choisie dans cette étude.

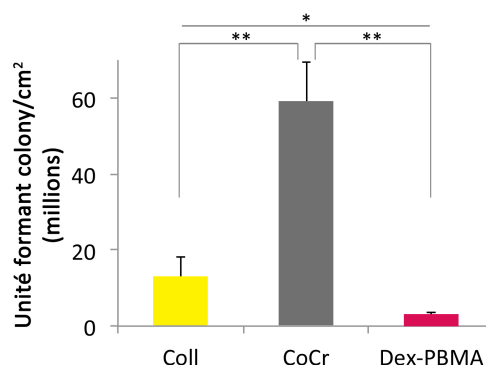


Figure 51 : Adhésion bactérienne

Adhésion de *Staphylococcus aureus* sur les disques de CoCr, les films de Dex-PBMA et des puits recouverts de collagène, contrôle positif. (n=3, * p<0,05, ** p<0,01)

La Figure 51 montre l'adhésion bactérienne sur les films de Dex-PBMA et les disques de CoCr par rapport à un contrôle collagène, témoin de l'adhésion à la matrice extracellulaire. Sur le Dex-PBMA, respectivement 11 et 4,49 fois moins de bactéries ont adhéré comparé au CoCr et au contrôle collagène ($p=0,0011$ et $p=0,0163$). En contraste, 4,67 fois plus de bactéries ont adhéré sur le CoCr que sur le contrôle ($p=0,0024$).

L'adhésion des *Staphylococcus aureus* sur une surface dépend notamment de son caractère hydrophobe, de l'adsorption des protéines ainsi que de la rugosité de cette surface.¹⁴² Malgré le fait que le CoCr soit moins hydrophobe le Dex-PBMA, l'adhésion bactérienne sur cet alliage est significativement très supérieure à celle du copolymère. L'électro-polissage des disques de CoCr pourrait avoir généré des micro-rayures qui serviraient de niche aux bactéries, cette hypothèse expliquerait la forte adhésion sur le métal nu. Le dextrane est un polymère favorisant l'adhésion bactérienne.¹⁵³ A l'inverse, des polymères dérivés du poly(méthyl metacrylate) (PMMA) ont déjà montré leur capacité à réduire l'adhésion bactérienne,¹³⁴ il semblerait que le Dex-PBMA puisse avoir des propriétés semblables. Ces propriétés antibactériennes nous semblent intéressantes pour un revêtement de stent.

3.3.2. Hémostabilité

3.3.2.1. Adhésion des plaquettes

Dans un premier temps l'adhésion des plaquettes sur les Dex-PBMA a été évaluée comme reflet de l'hémostase primaire. Elle fournit également des informations sur l'activation plaquettaire entrant en jeu dans la deuxième phase de la coagulation.

En conditions statiques : Tout d'abord l'adhésion plaquettaire a été évaluée en conditions statiques en utilisant une suspension de plaquettes lavées. Les résultats obtenus avec le Dex-PBMA par comparaison avec le CoCr et la BSA (contrôle négatif) sont présentés Figure 52. Ils sont exprimés en fonction de ceux obtenus dans les puits recouverts de collagène (contrôle positif, CTRL).

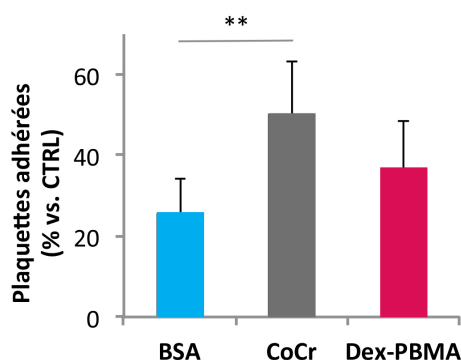


Figure 52 : Quantification de l'adhésion des plaquettes en conditions statiques après 2h d'incubation à RT sur des disques CoCr ou Dex-PBMA et des fonds de puits recouverts de BSA (contrôle négatif).

*Les résultats sont exprimés en proportion des plaquettes ayant adhéré sur des disques recouverts de collagène (contrôle positif, CTRL). (n=3, ** p<0,01)*

La Figure 52 montre que l'adhésion des plaquettes sur le Dex-PBMA est 2,7 fois inférieure au CTRL ($51,01 \pm 15,18\%$ vs 100% , $p < 0,0001$) et au CoCr ($36,67 \pm 14,64\%$). Bien que cette seconde différence ne soit pas significative ($p = 0,0613$), les images MEB de la Figure 53 illustrent ces résultats.

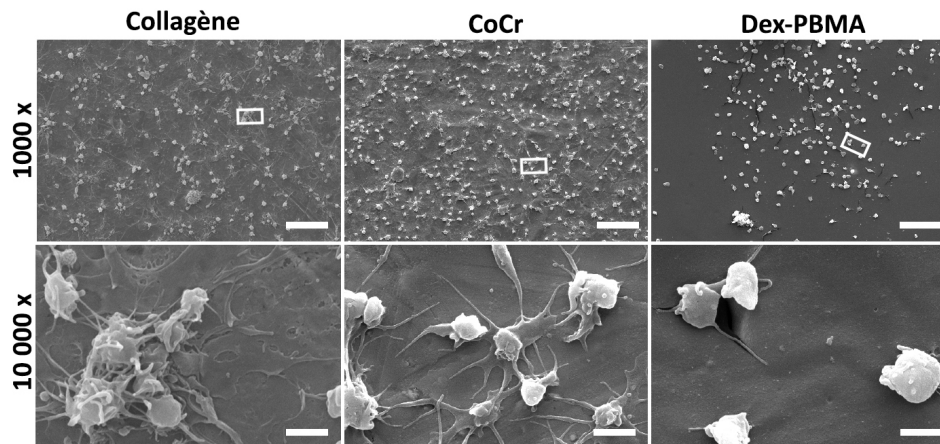


Figure 53 : Observation au MEB des plaquettes après adhésion en condition statique sur des disques collagène, CoCr et Dex-PBMA. Echelle 20 µm grossissement 2 µm.

De plus, l'activation d'une plaquette est liée à sa morphologie. En effet, une plaquette ronde à l'état non activée change progressivement de forme lorsqu'elle s'active. On distingue un stade dendritique où elle émet des filopodes, un stade intermédiaire d'étalement dendritique où elle s'étale en émettant des filopodes puis l'étalement complet au plus fort de son activation.¹⁵⁴ Les plaquettes ayant adhéré sur le Dex-PBMA conservent une forme ronde avec tout de même quelques filopodes signe d'une légère activation tandis que sur le CoCr elles sont dans un stade d'étalement dendritique. Sur le collagène, le plus fort grossissement montre une couche de plaquettes étalées recouvrant l'ensemble de la surface, ce qui témoigne d'une plus forte activation. Les plaquettes sont donc moins activées par le contact avec Dex-PBMA que celui avec le CoCr.

En conditions dynamiques : Ces conditions sont plus physiologiques, les plaquettes sont en contact de manière plus brève avec le matériau et elles subissent une force de cisaillement qui s'oppose aux interactions d'adhésion et peut provoquer le décollement des plaquettes.

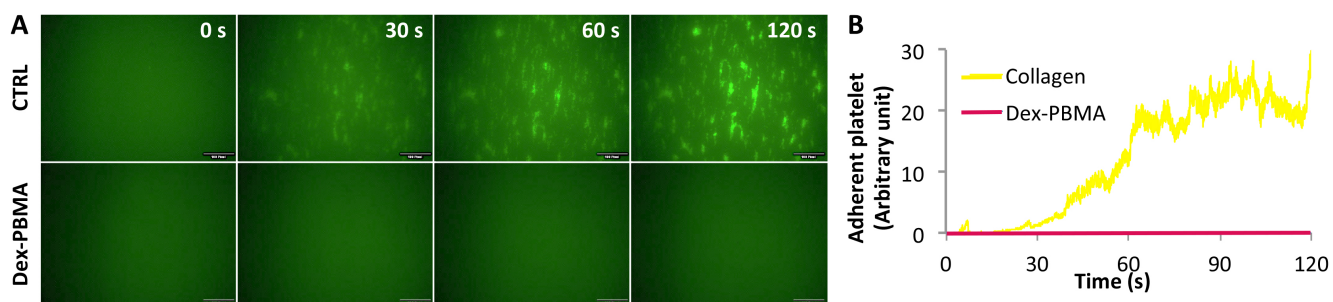


Figure 54 : Adhésion des plaquettes en conditions dynamiques

A – Images à intervalles réguliers B – Quantification du nombre de plaquettes adhérentes au cours du temps. Le sang total contenant les plaquettes marquées au dioc-6 est perfusé à vitesse physiologique ($\tau=1500\text{ s}^{-1}$) pendant 2 min à RT sur des lamelles de verre recouvertes de Dex-PBMA ou de collagène, contrôle positif.

Après 2 min, aucune plaquette n'a adhéré sur le Dex-PBMA tandis que le contrôle collagène en est recouvert (Figure 54). Néanmoins, quelques plaquettes ont adhéré momentanément et de manière isolée mais les interactions n'étant pas suffisamment fortes, les plaquettes ont été emportées par le flux. Le Dex-PBMA ne favorise donc pas l'adhésion plaquettaire.

Cette expérience ne permet pas de comparer avec le CoCr car elle nécessite des films transparents pour l'observation au microscope à contraste de phase.

3.3.2.2. Génération de thrombine

L'activation plaquettaire peut conduire à la génération de thrombine mais ce n'est pas le seul paramètre initiateur. Pour avoir un point de vue plus large sur la coagulation, la thrombine générée par contact avec le Dex-PBMA ou le CoCr a été évaluée en plasma riche ou pauvre en plaquette en présence ou en absence de facteur tissulaire. Afin de s'affranchir d'éventuelles différences entre individu, l'expérience a été répétée 6 fois ($n=6$) et les résultats sont exprimés en proportion du contrôle négatif, un revêtement d'immulon 2HB peu activateur de la génération de thrombine, puis les résultats obtenus sont comparés.

Tableau 17 : Génération de thrombine sur des disques Dex-PBMA et CoCr et des fonds de puits recouverts de collagène ($n=6$)

	PRP			PPP			
	Collagène	Dex-PBMA	CoCr	Collagène	Dex-PBMA	CoCr	
FT	Lagtime	63,87 ± 24,52	73,44 ± 15,70	68,5 ± 22,55	61,43 ± 12,98	86,13 ± 12,26	65,98 ± 13,07
	Peak	139,38 ± 35,51	130,84 ± 27,69	125,86 ± 25,34	298,07 ± 159,33	233,11 ± 90,18	284,80 ± 145,08
	tPeak	81,88 ± 11,69	81,13 ± 10,96	83,87 ± 10,14	52,54 ± 15,23	63,52 ± 21,86	67,63 ± 25,17
	VI	142,70 ± 31,70	150,20 ± 32,28	129,37 ± 24,16	1488,66 ± 394,54	688,102 ± 102	1297,37 ± 376,4
Sans FT	Lagtime	66,82 ± 19,60	78,84 ± 10,75	70,25 ± 16,92	72,94 ± 21,89	89,68 ± 9,80	78,59 ± 20,76
	Peak	129,51 ± 26,61	125,67 ± 24,13	115,92 ± 18,96	122,59 ± 27,43	103,71 ± 15,07	124,46 ± 26,03
	tPeak	79,12 ± 13,63	79,73 ± 9,14	82,27 ± 10,74	80,19 ± 13,38	86,90 ± 9,47	84,72 ± 14,36
	VI	137,12 ± 34,52	133,82 ± 28,22	128,40 ± 30,65	145,76 ± 31,46	134,20 ± 27,05	136,52 ± 28,5

Les résultats sont exprimés en pourcentage des résultats obtenus sur des fonds de puits recouverts d'immulon 2HB, control négatif. Les tests sont menés en plasma riche en plaquette (PRP) ou plasma pauvre en plaquette (PPP) avec ou sans facteur tissulaire (FT). VI : Indice de vélocité

Quel que soit le revêtement ou matériau de contact, collagène, Dex-PBMA ou CoCr, le temps de latence et le temps d'atteinte du pic sont réduits et le « peak » et l'indice de vélocité sont accrus. Toutes ces surfaces augmentent donc la génération de thrombine. En présence de plaquettes – PRP, avec ou sans FT, les résultats sur le collagène, les disques CoCr ou Dex-PBMA ne sont pas statistiquement différents. A l'inverse, le VI en présence de FT et en l'absence de plaquette – ie PPP – est 1,9 fois plus bas sur le Dex-PBMA que sur le CoCr (Tableau 17). Cette différence est significative ($p=0,0058$), tandis que sans FT aucune différence n'est relevée.

Certaines modifications de la surface de la structure métallique des stents peuvent améliorer leur hémocompatibilité qui dépend en partie de la topographie de la surface de contact et de ses interactions chimiques avec les éléments sanguins. Par exemple, une certaine couche d'oxydation du CoCr peut diminuer l'adhésion plaquettaire comparé au CoCr brut.¹⁵⁵ D'autres revêtements ont pour but de rendre l'implant plus furtif en imitant ou présentant en surface des composants de la paroi artérielle. C'est le cas de revêtements incluant des polymères basés sur l'élastine naturelle obtenus par recombinaison qui réduisent l'adhésion plaquettaire et la formation de fibrine comparé au Gore-Tex¹⁵⁶ ou du collagène immobilisé sur des nanofibres de polycaprolactone (PCL).¹⁵⁷ Dans le second cas c'est à la fois la topographie et la composition chimique du revêtement qui améliore l'hémocompatibilité de la surface, les nanofibres de PCL avec ou sans collagène immobilisé induisant une plus faible génération de thrombine, adhésion et activation plaquettaire que les films de PCL.¹⁵⁷ Des molécules ayant des propriétés anticoagulantes avérées, comme l'héparine, greffée sur un copolymère de polydopamine et hexaméthylendiamine ont aussi démontré leur capacité à réduire l'activation plaquettaire¹⁵⁸.

La comparaison des revêtements présentés dans la littérature et du Dex-PBMA est délicate car même si les tests mis en œuvre sont similaires – évaluation de l'adhésion plaquettaire,¹⁵⁵⁻¹⁵⁸ morphologie des plaquettes,^{157,158} génération de thrombine¹⁵⁷ – les méthodes diffèrent : utilisation de sang total,¹⁵⁵ quantification fluorescence,^{157,158} quantification du complexe thrombine anti-thrombine comme marqueur de la génération de thrombine...¹⁵⁷

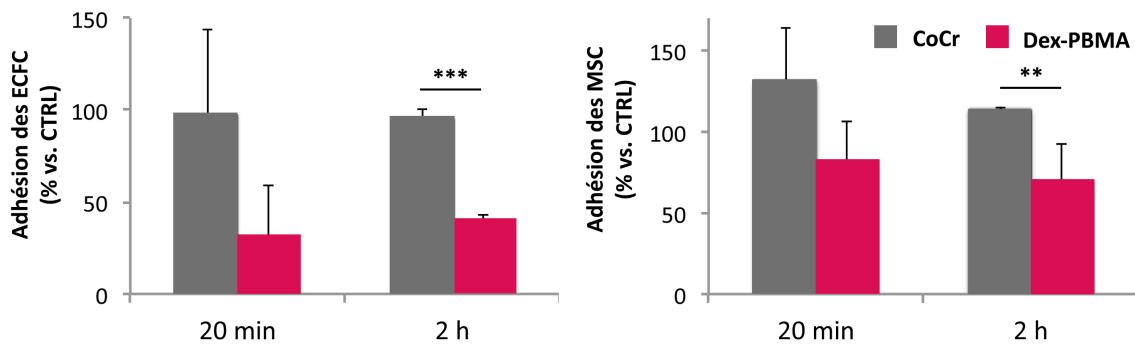
Le dextrane est un matériau connu pour sa bonne hémocompatibilité et est utilisé en clinique comme complément sanguin. Il est même utilisé pour ses propriétés dans des revêtements de stent biorésorbables.¹⁵⁹ Le Dex-PBMA conserve certains de ces paramètres. L'adhésion des plaquettes sur le copolymère est faible mais une légère activation plaquettaire semble conduire à une génération de thrombine modérée. Cependant, la faible thrombogénicité du Dex-PBMA est donc intéressante et limite donc le risque de thrombose comparée au CoCr nu.

3.3.3. Interactions avec les cellules circulantes

La face luminale du stent est en contact avec le sang et tous ses composés, notamment les cellules circulantes. Parmi elles, les progéniteurs endothéliaux qui peuvent jouer un rôle dans la réendothélialisation de la prothèse. C'est pourquoi les interactions entre les progéniteurs endothéliaux (ECFC) et le Dex-PBMA ont été étudiées. Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) ont également été utilisées.

3.3.3.1. Adhésion des ECFC et MSC

Dans un premier temps les adhésions intermédiaires, à 20 min, et focales, à 2 h, ont été évaluées sur les disques Dex-PBMA et CoCr.

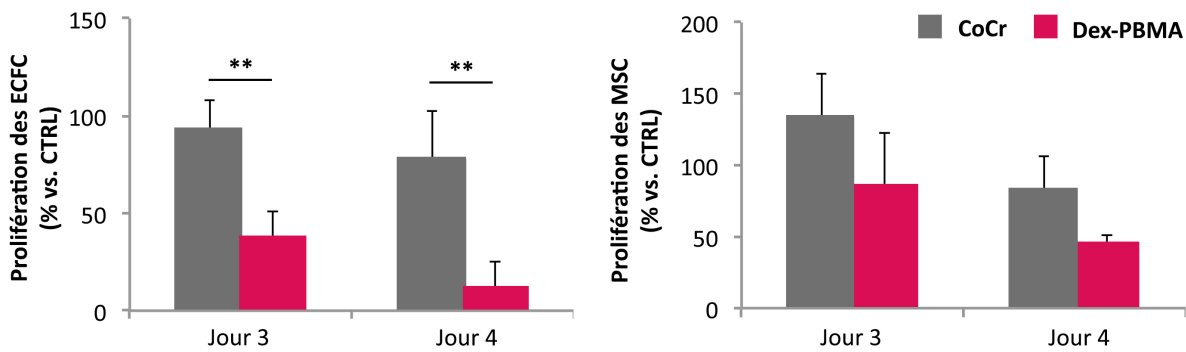


*Figure 55 : Adhésion cellulaire sur des disques CoCr et Dex-PBMA intermédiaire (20 min) et focale (2 h) des cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) et cellules souches mésenchymateuses (MSC). Les résultats sont exprimés en proportion de ceux obtenus sur des fonds de puits recouverts de gélatine (CTRL). (n=3, ** p<0,01, *** p<0,001)*

Les ECFC et MSC adhèrent moins sur les disques recouverts de Dex-PBMA que sur les CoCr nu (Figure 55). Cette différence n'est pas significative lors de l'adhésion intermédiaire mais le devient dans le cas de l'adhésion focale. Il y a moins d'adhésion sur le Dex-PBMA que sur le CoCr : respectivement 2,4 et 1,6 fois moins d'ECFC (39,32 ± 4 % vs. 94,55 ± 6 %) et de SMC (70,78 ± 25 % vs. 109,11 ± 8 %).

3.3.3.2. Prolifération des ECFC et MSC

L'adhésion seule n'est pas suffisante, il faut que les cellules adhérentes soient ensuite capables de se diviser afin d'augmenter leur nombre et de recouvrir une surface plus importante. Dans un second temps la prolifération des ECFC et MSC a donc été évaluée à 3 et 4 jours.



*Figure 56 : Prolifération cellulaire sur des disques CoCr et Dex-PBMA des cellules endothéliales formant des colonies (ECFC) et cellules souches mésenchymateuses (MSC) après 3 et 4 jours de culture. Les résultats sont exprimés en proportion de ceux obtenus sur des fonds de puits recouverts de gélatine (CTRL). (n=3, ** p<0,01)*

Une tendance semblable à celle de l'adhésion est observée, dans les deux cas le pourcentage de cellules décroît entre J3 et J4 (Figure 56) ce qui signifie que la prolifération est plus lente que sur le contrôle (CTRL) – fond de puits recouvert de gélatine.

Le nombre d'ECFC est significativement inférieur sur le Dex-PBMA comparé au CoCr (38 ± 13 % vs 91 ± 17 % à J3 et 11 ± 14 % vs 76 ± 26 % à J4). De plus 51,7 % d'ECFC ont proliféré sur le CoCr comparé au CTRL et -106,9 % sur le Dex-PBMA. Le CoCr ralentit donc la prolifération des ECFC tandis que sur le Dex-PBMA des cellules meurent.

Concernant les MSC, les différences de nombre de cellules à J3 et J4 ne sont pas significatives. Dans les deux cas, comparée au CTRL, la prolifération est négative (Dex-PBMA -76,5 % ; CoCr -41,9 %) ce qui indique une diminution du nombre de cellule. Cette diminution pourrait être analysée de manière plus poussée afin de déterminer s'il s'agit d'apoptose, par exemple, par dosage de l'annexine V.¹⁶⁰

In vitro ces surfaces semblent donc ne pas favoriser l'adhésion et la prolifération des ECFC et MSC cependant ces tendances doivent être confirmées *in vivo* car le contact avec les protéines plasmatiques peut influencer sur ces résultats.

Néanmoins la réendothélialisation par des cellules endothéliales fonctionnelles de la zone lésée et des mailles du stent étant un facteur clé pour éviter la thrombose tardive,¹⁶¹ il est indispensable de s'assurer de son bon déroulement. Plusieurs mécanismes entrent en jeu, les cellules endothéliales matures adjacentes à la lésion peuvent proliférer ou des cellules circulantes peuvent adhérer puis se différencier en cellules endothéliales. Etant donné que dans le premier cas, il a été démontré que la prolifération des cellules endothéliales adjacentes est limitée,¹⁶² nous avons choisi d'analyser le comportement des cellules circulantes sur de Dex-PBMA. Il s'agit notamment des progéniteurs endothéliaux circulant (PEC)¹⁶³ et des MSC qui ont la capacité dans certaines conditions de se différencier en cellules endothéliales.¹⁶⁴ Au delà de la non-toxicité, Obi *et al.* ont démontré que le dextrane favorise l'adhésion des

PEC.¹⁶⁵ C'est pourquoi nous avons étudié l'adhésion des cellules circulantes *in vitro*, telles les ECFC et MSC. Elle est modérée sur le Dex-PBMA et la prolifération est fortement ralentie, L'hydrophobicité du copolymère est peut être une cause de ces résultats. En effet, Kim *et al.*¹⁴¹ ont démontré l'influence de la mouillabilité d'une surface sur la prolifération de fibroblastes. En particulier, l'adhésion cellulaire semble être favorisée sur une surface ayant un angle de contact entre 50° et 60° et très diminuée en dessous de 90°. Le caractère hydrophobe du Dex-PBMA pourrait donc être une hypothèse expliquant cette faible adhésion et prolifération. Ici, la passivation a été réalisée par du SVF contenant majoritairement de la BSA, l'albumine étant la principale protéine plasmatique.

Malgré ce résultat moins prometteur, nous avons poursuivi l'étude du copolymère car *in vivo*, un nombre plus varié de molécules et notamment de protéines s'adsorbent à la surface et les résultats peuvent alors différer de ceux trouvés *in vitro*.

Cependant si la réendothélialisation *in vivo* était trop lente, l'incorporation d'éléments attirant les progéniteurs endothéliaux circulant (PEC) pourrait être envisagé. Cette stratégie est déjà développée via le greffage d'anticorps anti-humain CD34 ou CD 133 se liant à la surface des PEC.^{62,166} C'est le cas par exemple du Combo stent d'OrbusNeich Medical dont la surface luminale est recouverte de ces anticorps CD 34+ tandis que sur la surface abluminal un revêtement libère du Sirolimus afin de limiter la prolifération des cellules musculaires lisses.⁶² Toutefois, si le principe semble idéal pour limiter resténose et thrombose, les résultats *in vivo* chez l'homme sont plus mitigés. L'étude REMEDEE incluant 83 patients pendant 12 mois a montré la non-infériorité du Combo stent comparé au Taxus Liberté, DES de Boston Scientific libérant du paclitaxel.⁹⁸ Barsotti *et al.* pensent que ces faibles résultats sont dûs à un manque de spécificité des anticorps. Afin d'améliorer le recrutement des PEC, ils ont décidé d'utiliser un aptamère, un oligonucléotide ayant de fortes affinité et spécificité pour les PEC.¹⁶⁷

3.3.4. Dex-PBMA comme plateforme de libération de substances

Même si le copolymère a été décrit comme limitant la prolifération des CML et favorisant celle des cellules endothéliales,² il se peut que les résultats obtenus *in vitro* et en cultures séparées soient plus modérés *in vivo*. De plus, au sein du programme PRESTIGE, les équipes du WP1 travaillent à la mise au point d'une molécule ciblant la thrombose tardive, celle-ci pourra peut-être être greffée ou libérée par le Dex-PBMA. Les premiers résultats *in vivo* d'implantation du copolymère en intramusculaire ayant abouti à la formation d'une fine chape fibreuse, son utilisation en tant que plateforme de libération est envisageable. Cependant il faut également vérifier qu'une molécule incluse dans le revêtement est capable d'en sortir.

Afin de vérifier cette faisabilité, une molécule modèle a été choisie : le tacrolimus. Ce choix a été motivé par l'existence d'anticorps permettant son dosage. Une artère stentée *ex vivo* a été placée dans un milieu de culture adapté à 37°C, sous flux ($\sigma=1000 \text{ s}^{-1}$) et de petites fractions du milieu ont été prélevées au cours du temps. La

concentration en tacrolimus dans les prélèvements a été dosée par cytométrie en flux via l'utilisation de la technologie xMAP®, c'est à dire d'un multiplexe permettant le dosage d'éléments à faible concentration dans de petits volumes.

En parallèle, la viabilité des artères après 6 jours dans le système de flux a été vérifiée par un test MTT qui a donné des valeurs comparables à celle des artères contrôles fraîchement prélevées.

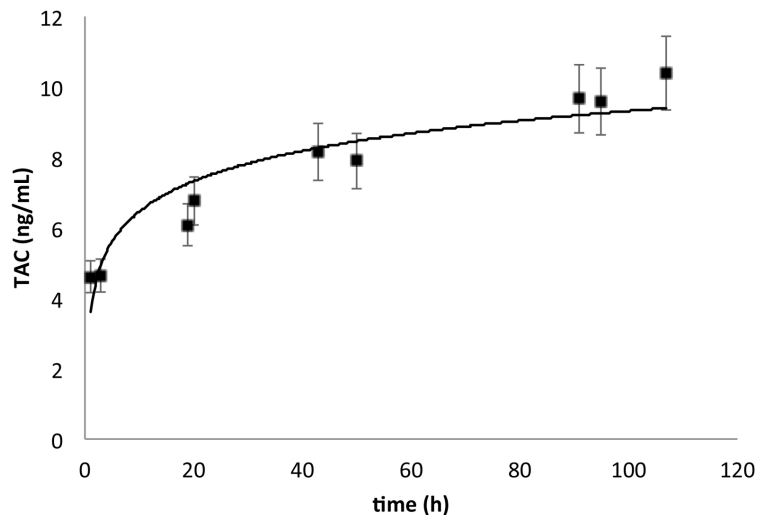


Figure 57 : Libération du tacrolimus par le Dex-PBMA_{TAC}

Dosage au cours du temps du tacrolimus libéré dans le milieu de culture d'un stent Dex-PBMA_{TAC} placé ex vivo dans une artère de rat sous flux ($\sigma=1000 \text{ s}^{-1}$) pendant 5 jours.

La Figure 57 nous montre la concentration en tacrolimus libéré dans le milieu de culture par un revêtement de Dex-PBMA_{TAC} au cours du temps. Des prélèvements de milieu ont été réalisés de 1 h à 107 h après la mise sous flux. La moitié de la quantité totale de tacrolimus libérée dans le milieu est libérée dans les premières heures suivie d'une libération lente, respectivement 5 ng/mL en 3 h et 10 ng/mL en 96 h. Le profil observé présente un effet « burst », c'est à dire une forte quantité les premiers temps puis une libération lente jusqu'à un palier, et correspond à une libération rapide, similaire à celui de certain stents commerciaux à élution de sirolimus¹⁶⁸.

Plusieurs études attribuent l'échec des DES à une cinétique de relargage inadaptée, une dose trop importante au départ réduirait l'effet des molécules libérées.^{53,169} En effet, l'objectif est de limiter la prolifération des CML sans dégrader la croissance des CE. Une surdose de principe actif altère la cicatrisation endothéliale et une sous dose à long terme n'empêche plus le développement des CML, d'où l'importance de maîtriser la cinétique de libération. Même si la quantité de molécules libérées est plus élevée dans un premier temps un niveau suffisant à son efficacité doit être maintenu pendant au moins un mois.¹⁶⁹ Les études de cinétique de libération sont souvent réalisées *in vitro* dans des milieux sous agitation ce qui permet d'avoir la totalité des molécules libérées¹⁶⁸ ou *in vivo* après dosage de la quantité dans les tissus proche du DES.¹⁷⁰ L'avantage d'un système de dosage *ex vivo* est qu'il permet de calculer la quantité de

principe actif libéré dans le tissu artériel et dans la circulation sanguine.

Malheureusement, les moyens d'extraction du tacrolimus des tissus via des détergents aqueux essayés n'ont pas aboutis,¹⁷¹ la quantité de tacrolimus libérée dans la paroi artérielle n'a donc pas pu être quantifiée. Une autre limitation de cette étude concerne la quantité totale de tacrolimus contenu dans le revêtement car même si la concentration en principe actif de la solution de revêtement du stent est connue, la quantité utile de cette solution ne l'est pas étant donné le revêtement par trempage et les petits volumes utilisés. Les comparaisons directe avec les DES commercialisés ne sont donc pas possible.

Cependant, par cette expérience la faisabilité de se servir du Dex-PBMA comme plateforme de libération a été entrevue. La cinétique de libération dépend de nombreux facteurs :¹⁶⁹ polymère, molécule éluee, méthode de revêtement, stockage de la molécule, épaisseur du revêtement, tailles des pores du revêtement, hémodynamique... Autant de paramètres sur lesquels il est parfois possible d'agir pour adapter la cinétique de libération. En effet, il est possible par exemple de combiner des couches avec et sans molécule afin de ralentir la libération.⁵³ Dans le cas des stent Dex-PBMA, la libération de la molécule modèle, beaucoup trop rapide dans les conditions proposées, reste donc à optimiser. Cette étape sera réalisée ultérieurement en fonction de la molécule choisie. Un bio-réacteur plus performant tel celui mis au point par Maurel *et al.*¹⁷² ayant un flux plus fidèle au flux artériel pourrait être utilisé. De plus l'avantage du Dex-PBMA est qu'avec son composant hydrophile – le dextrane – et son composant hydrophobe – le PBMA – on peut envisager l'utilisation de ces deux types de molécules.

3.3.5. Implantation *in situ* chez l'animal

3.3.5.1. Modèle d'aorte abdominale chez le rat

Des stents Dex-PBMA ont été implantés dans des aortes abdominales saines de rat par abord direct. Ce modèle a été choisi pour vérifier la tolérance du revêtement Dex-PBMA *in situ*.

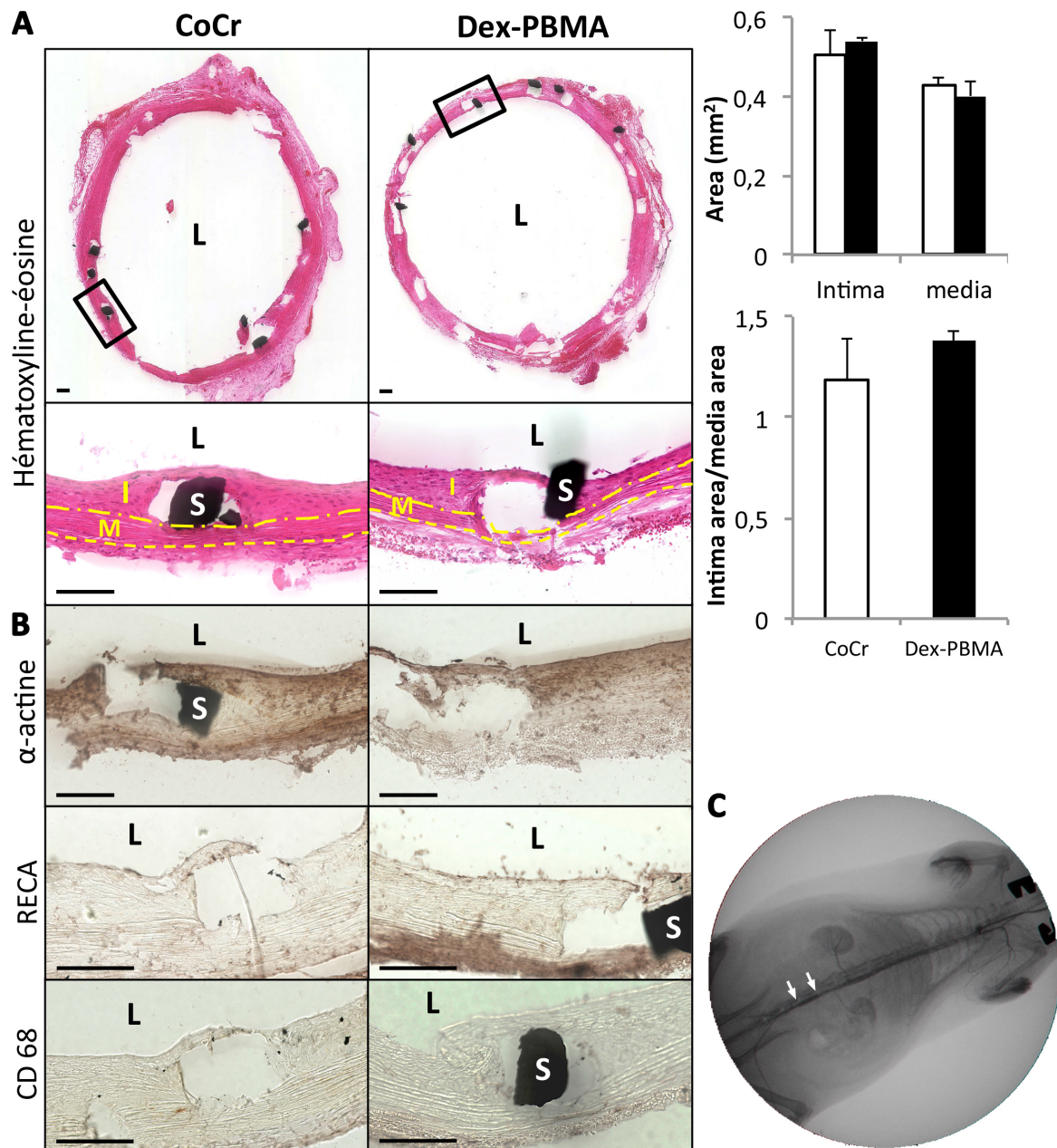


Figure 58 : Implantation de stent Dex-PBMA et CoCr chez le rat
 Implantation dans l'aorte abdominale après 30 jours. Echelles 100 μ m.

A – Gauche : Coloration hématoxyline-éosine. L indique la lumière, l'intima – délimitée par la lumière et la lame élastique interne (– . . . –), M la média – délimitée par les lames élastiques interne et externe (– _ _) et S les mailles du stent.

Droite : Quantification de l'hyperplasie intimale sur le Dex-PBMA (■) et le CoCr (□). Comparaison des aires de l'intima et de la média ainsi que de leur ratio. (n=3, aucune différence significative)

B – Immuno-marquages α -actine (cellules musculaires lisses), RECA (cellules endothéliales) et CD 68 (macrophages)

C – Angiographie à J30 avec injection de produit de contraste montrant la perméabilité du stent Dex-PBMA dont les extrémités sont indiquées par des flèches

Aucune thrombose n'a été observée immédiatement après l'implantation. Après 30 jours, les 6 rats ayant reçu un stent Dex-PBMA ou CoCr ont survécu. Les angiographies à 30 jours confirment que les artères sont perméables (Figure 58C). La Figure 58A montre qu'aucun thrombus ne s'est formé au niveau du stent. Néanmoins, une légère prolifération intimale est observée sur les deux types de stents sans différence significative entre le Dex-PBMA et le CoCr ni pour l'aire de l'intima ($0,54 \pm 0,007 \text{ mm}^2$ vs. $0,50 \pm 0,06 \text{ mm}^2$) ni pour la média ($0,40 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ vs. $0,43 \pm 0,02 \text{ mm}^2$). Aucun macrophage n'a été identifié dans les parois artérielles (marquage CD 68, Figure 58B). Comme le montre l'immuno-marquage à l' α -actine (Figure 58B), les néointima sont principalement composées de SMC. De plus, ces couches de SMC sont recouvertes par un endothélium (marquage RECA, Figure 58B) aussi bien sur le stent Dex-PBMA que sur le stent CoCr.

3.3.5.2. Modèle d'hyperplasie intimale chez le lapin

Ces résultats doivent être confirmés dans un modèle pathologique. Le choix du modèle d'hyperplasie intimale chez le lapin est justifié par le fait qu'il s'agit d'un modèle fiable plusieurs fois utilisé^{137,173} et facile à mettre en œuvre. Des stent Dex-PBMA, Dex-PBMA_{TAC} et CoCr ont été implantés dans les artères iliaques de 3 lapins.

Les lapins ont tous survécu 30 jours et les prélèvements des artères iliaques ont pu être analysés comme le montre la Figure 59. Sur les colorations hématoxyline-éosine (Figure 59A), les artères stentées présentent une légère formation néointimale quelque soit le type de stent implanté. Les mesures de ces dernières indiquent que le ratio entre l'aire de la média et celle de l'intima est supérieur sur le stent Dex-PBMA comparé au stent nu (2,39 vs 1,90) tandis qu'il est minimal sur le stent Dex-PBMA_{TAC} (1.60). Ceci laisse donc supposer l'efficacité du Tacrolimus libéré.

D'autre part des prélèvements de sang avant implantation et avant sacrifice ont été réalisés et leur concentration en TNF- α a été mesurée. TNF- α est une cytokine impliquée dans l'inflammation. La différence de ces deux valeurs, présentée Figure 59B, indique une augmentation de cette cytokine sur le stent CoCr (+15.6 pg/mL), une variation minime sur le stent Dex-PBMA (+0.53 pg/mL) et une diminution sur le stent (-4,87 pg/mL). Le revêtement Dex-PBMA semble donc induire une faible réponse inflammatoire chez le lapin.

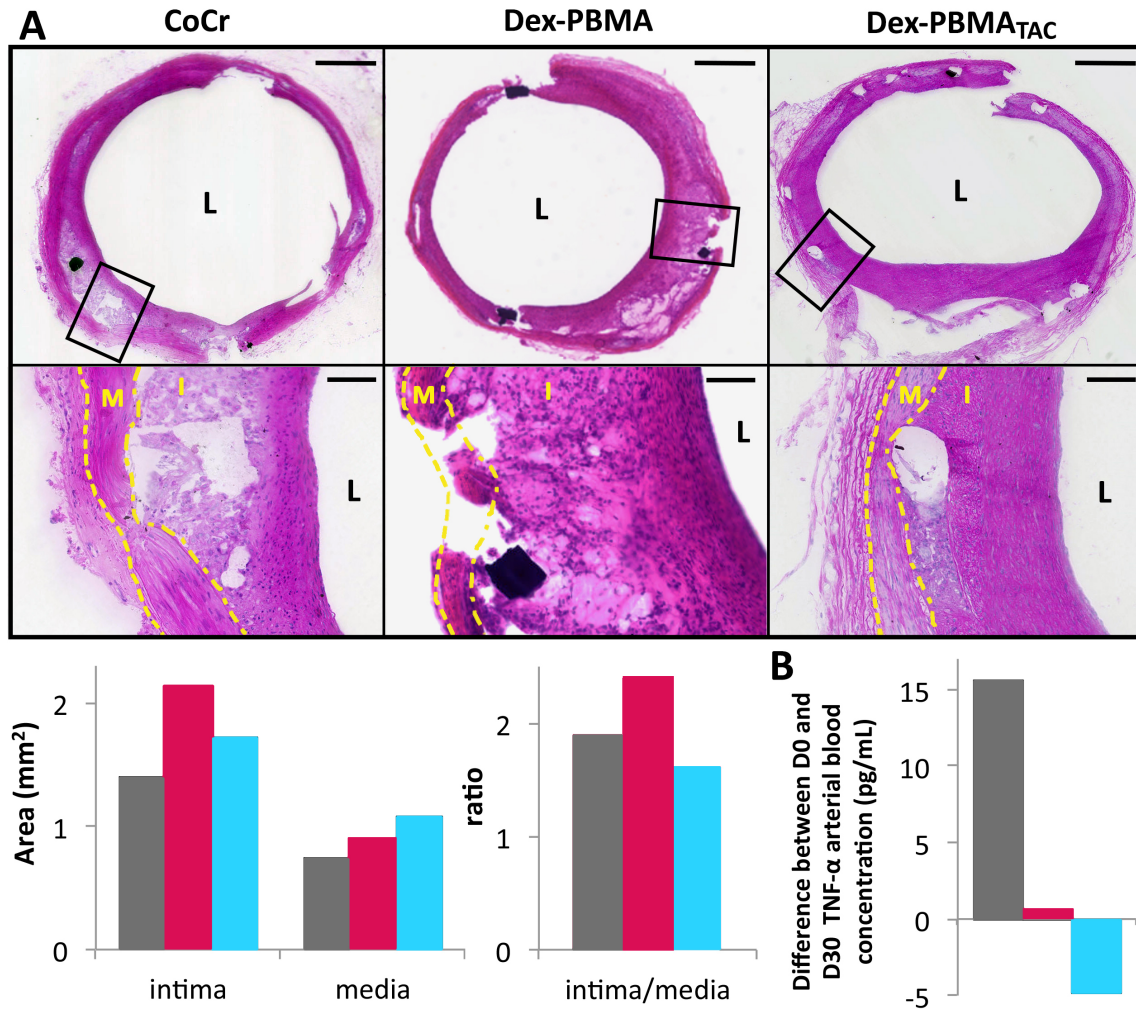


Figure 59 : Implantation de stent Dex-PBMA, Dex-PBMA_{TAC} et CoCr chez le lapin
Modèle d'hyperplasie intimale dans l'artère iliaque après 30 jours. (n=1)

A – Haut : Coloration hématoxyline-éosine. L indique la lumière, I l'intima – délimitée par la lumière et la lame élastique interne (_ . _ . _), M la média – délimitée par les lames élastiques interne et externe (_ _ _). Echelles 500 μm grossissement 100 μm

Bas : Quantification de l'hyperplasie intimale sur le Dex-PBMA (■), le Dex-PBMA_{TAC} (■) et le CoCr (■). Comparaison des aires de l'intima et de la média ainsi que de leur ratio.

B – Différence de concentration de TNF-α dans le sang entre l'implantation et après 30 jours

Les résultats obtenus chez le lapin sont donc en accord avec ceux obtenus chez le rat. Les mailles du stent sont dans les deux cas recouvertes d'un tissu. Toutefois, du fait de la stimulation mécanique de l'artère, l'hyperplasie intimale est plus importante chez le lapin (ratio aire intima/media 1,90 vs 1,18 \pm 0,20 pour le CoCr et 2,39 vs 1,38 \pm 0,05 pour le Dex-PBMA). Comme observé *in vitro*, l'adhésion plaquettaire faible n'a pas abouti à la formation d'un thrombus sur les mailles du stent. De plus, aucune réaction de rejet n'a été détectée à la fois au niveau de la paroi artérielle et du compartiment sanguin. Nakazawa *et al.* mettent en avant un grand nombre de macrophages dans la néointima lors de l'implantation de stent dans l'iliaque de lapin.¹⁷⁴ Le marquage CD 68 chez le rat n'a pas souligné une telle présence de macrophage, il est possible que cette différence soit due à l'espèce et au modèle utilisé. En effet, les réactions inflammatoires sont plus importantes chez le lapin rendu hypercholestérolémique¹⁰⁴ que chez le rat d'autant plus que dans ce dernier, il s'agit d'aorte abdominale saine.

Cependant une limitation majeure à l'expérience lapin est le nombre d'animaux beaucoup trop faible pour confirmer ou infirmer les hypothèses. Il ne s'agit là que d'un premier aperçu visant à confirmer la faisabilité de ce modèle et à entrevoir l'impact du Dex-PBMA avec ou sans molécule active dans un modèle pathologique.

En effet, le sertissage manuel des stents une fois recouverts sur le ballonnet implique une tenue plus faible de celui-ci. Dans le modèle rat, le système stent et ballon est introduit via un introducteur jusqu'au site de déploiement et l'introducteur est ensuite retiré, le stent subit donc un minimum de frottement. Tandis que dans le modèle lapin, le stent parcourt le chemin de la carotide à l'iliaque sans protection, il subit donc le frottement contre les parois artérielles parfois sinueuses. Ce point a d'ailleurs nécessité des ajustements car lors de la prise en main du modèle certains stents ont glissé de leur ballon.

CHAPITRE

3

CONCLUSIONS

La coronaropathie est une cause majeure de morbidité et mortalité au sein de la population européenne. Actuellement, l'angioplastie coronarienne transluminale percutanée suivie d'une pose de stent est la technique de revascularisation la plus utilisée. Beaucoup moins invasive que le pontage, elle est plus économique et a considérablement amélioré la qualité de vie des patients. La première génération de stents, les stents nus, a amélioré de façon substantielle l'efficacité et la sécurité de l'angioplastie coronarienne, mais dans 30 % des cas, la survenue d'une resténose intra-stent limitait jusqu'à présent leur bénéfice à long terme.^{5,6} La resténose des stents est caractérisée histologiquement par une prolifération néo-intimale de cellules musculaires lisses.⁹ Une deuxième génération de stents libérant progressivement un principe actif antiprolifératif a donc été mise au point pour limiter la formation de néo-intima et ainsi la resténose. Toutefois il semblerait que l'implantation de ces stents actifs corresponde à une augmentation des cas de thrombose tardive de stents, évènement souvent fatal pour le patient.^{77,175} Cette thrombose tardive pourrait être notamment liée à un défaut de réendothélialisation du stent¹⁰⁶ conduisant à une accumulation de plaquettes et une activation de la coagulation.

Pour répondre à ces problématiques de nombreuses recherches ont été menées afin de mettre au point de nouveaux stents plus performant. Un stent peut être considéré comme l'association de 3 modules : 1/ la plateforme qui assure la force radiale, la flexibilité et l'opacité du stent par rayon X, 2/ le principe actif qui améliore l'intégration de l'implant et 3/ le revêtement polymérique, réservoir du principe actif et régulateur de la cinétique de libération.¹⁷⁶

Les premiers alliages de stents, le Nitinol et l'acier inoxydable, ont souvent laissé place à de nouveaux alliages tel le Cobalt-Chrome (CoCr) ou le Platine-Chrome (PtCr) permettant à force radiale égale des mailles d'épaisseur plus faible.^{22,26,66} Plusieurs études ont démontré l'impact de l'épaisseur des mailles du stent sur l'intégration de ce dernier, des mailles plus fines engendrent moins de resténose.^{25,177} Au delà l'épaisseur, l'intégralité de la forme du stent est à prendre en compte : la section de la maille modifie l'écoulement sanguin^{176,178} et les connecteurs entre les mailles permettent plus ou moins de flexibilité.¹⁷⁷ L'objectif visé est une congruence optimale entre le stent et la paroi du vaisseau. Ainsi, les perturbations de flux sont minimisées et le contact entre le sang et le corps étranger est réduit.¹⁷⁷ Les problèmes de mauvais déploiement des stents sont donc incriminés dans la thrombose tardive.^{105,177} Des techniques d'imagerie intravasculaire comme l'échographie intravasculaire (IVUS) ou la tomographie en cohérence optique (OCT) sont utilisées pour suivre l'évolution des stents lors des suivis cliniques.^{111,112,179} Ces deux techniques ondulatoires, la première utilisant le son et la deuxième la lumière, permettent d'évaluer plus ou moins précisément le recouvrement des mailles, l'hyperplasie néointimale, la mauvaise congruence d'une maille ou la présence de thrombus.^{178,180} L'OCT a une meilleure résolution et permet d'imager plus nettement les mailles du stent¹⁵⁰ tandis que l'IVUS fourni de meilleures caractérisations

des tissus et mesures quantitatives, cependant les deux techniques peuvent être une source d'endommagement de la paroi artérielle tel un arrachement de cellules endothéliales.¹⁸⁰

Lors du développement des premiers DES, deux principes actifs bloquant le cycle des CML³² ont principalement été utilisés : le sirolimus et le paclitaxel.^{44,48,176} Le premier ayant fourni de meilleurs résultats que le second, le sirolimus et ses dérivés – everolimus, zotarolimus, biolimus, umirolimus et novolimus – sont majoritairement incorporés dans les DES des générations suivantes.^{32,44-46,176} Leur efficacité ne dépend pas seulement du mode d'action, leur dosage et la cinétique de libération sont des facteurs clés de leur réussite.¹⁷⁶ La concentration locale en principe actif doit être suffisamment élevée pour agir contre la resténose sans pour autant atteindre la dose toxique.^{169,176}

Pour obtenir des cinétiques de libération adéquates, la majorité des DES est recouverte d'un polymère dans lequel le principe actif est introduit. Les polymères hydrophobes facilitent l'incorporation de la molécule ainsi que le contrôle de la libération tandis que les polymères hydrophiles, de part leur tension de surface moindre, induisent une meilleure biocompatibilité.¹⁷⁶ C'est pourquoi les polymères fortement hydrophobes de la première génération de DES ont laissé place à des copolymères hydrophile/hydrophobe.¹⁷⁶ Les stratégies de revêtement sont également étoffées afin d'améliorer la cinétique de libération.^{47,61,62,70} Des revêtements dégradables, à base de PLLA, ont été mis au point libérant les molécules actives au fil de leur dégradation.⁶² Ces revêtements ont été conçus pour limiter l'hypersensibilité aux polymères qui peut être à l'origine de retard d'endothélialisation.⁶² Certains de ces stents ont démontré leur supériorité par rapport aux revêtements permanents ;^{86,93,94} cependant certains produits de dégradation ont engendré une inflammation tissulaire pouvant conduire à une thrombose tardive de stent.¹⁸¹

En parallèle, des stents complètement biorésorbables (BRS) ont été développés. Les matériaux utilisés pour les BRS sont soit à base de PLLA qui se dégrade par hydrolyse en acide lactique métabolisé en CO₂ et H₂O via le cycle de Krebs, soit à base de magnésium (Mg) qui se dégrade en sel inorganique.¹⁸² L'objectif de ce type de stent, plus couramment appelé « scaffold » *ie* échafaudage, est d'apporter un maintien mécanique à l'artère le temps de sa cicatrisation puis se résorber. Pour cela, leur durée de dégradation varie de 1 à 3 ans pour ceux en PLLA à 2 à 12 mois pour ceux en Mg et des principes actifs peuvent être ajoutés.¹⁸² Même si le principe d'un stent transitoire ne laissant pas de trace après cicatrisation du vaisseau est très séduisant et que les BRS représentent une avancée majeure, il est important de poursuivre leur développement et d'avoir plus de recul. Certains BRS ont déjà obtenu un marquage CE et sont disponibles en clinique depuis plus de 5 ans tel le stent Igaki-Tamai¹¹⁵ et l'Absorb BVS de Abbot Vascular.^{178,183} Pour le premier, après 10 ans, le taux de resténose est de 28 % et le caractère pro-inflammatoire des produits de dégradation est discuté.^{181,184} Pour le second, après 5 ans, un taux élevé de thrombose de stent allant jusqu'à 3 % a été

constaté en particulier dans le cas de lésion complexe.¹⁸³ Les mailles épaisses des BRS – 60-80 μm pour les structures en CoCr ou PtCr vs. 120-200 μm pour les structures à base de PLLA ou Mg – sont mise en cause.^{177,183} Pour le moment, les BRS n’ont pas démontré leur supériorité sur les DES ; ils semblent plus thrombogénique, plus inflammatoire et ont une réendothélialisation moindre.¹⁸⁵

Dans ce contexte nous avons développé au laboratoire de nouveaux matériaux pour le recouvrement de stents associant des polysaccharides hydrophiles (Dextrane) à des polymères synthétiques hydrophobes (PBMA). L’association de ces deux composés en un copolymère (Dex-PBMA), dans certaines proportions, limite *in vitro* la croissance des cellules musculaires lisses et favorise la prolifération des cellules endothéliales. De plus le Dex-PBMA sous forme de film présente une élasticité adaptée au recouvrement de stents. L’objectif de mon travail de thèse est de **poursuivre l’évaluation du Dex-PBMA utilisé en tant que revêtement de stent pour une application cardio-vasculaire.**

Les premières propriétés requises pour un revêtement de stent sont le bon maintien du revêtement sur le ballon, la résistance aux contraintes de déformation lors de l’implantation et sa stabilité dans les différentes phases.⁵² Pour s’assurer de cela, des tests d’élasticité et des observations MEB du revêtement après mise en conditions dynamique ont été réalisés. Le Dex-PBMA a **des propriétés mécaniques adaptées au revêtement de stent** et semble **résister au flux**. Il reste cependant à s’assurer de la stabilité lors des phases de stockage.

La biocompatibilité avec le compartiment vasculaire et sanguin est également un paramètre crucial.⁵² La **faible adhésion bactérienne du Dex-PBMA** est un point clé pour limiter les infections de prothèse. L’hémocompatibilité du stent a été abordé du point de vue des plaquettes et de la génération de thrombine. Les résultats sont encourageants : **l’adhésion plaquettaire sur le Dex-PBMA est faible** et la **génération de thrombine modérée**, ce qui constitue une **tendance à limiter la thrombose**, en particulier en phase aigue. La mise au point d’un DMI nécessite la détermination des interactions cellules/matériaux. Elles ont été évaluées via des test *in vitro* et des implantation *in vivo*. Entre le Dex-PBMA et les cellules circulantes : progéniteurs endothéliaux et cellules souches mésenchymateuses, les résultats sont mitigés. En effet, *in vitro*, **les cellules n’ont pas adhéré facilement et leur prolifération était lente**. Cependant, dans le système plus complexe et multifactoriel que sont les tests *in vivo*, les résultats peuvent différer. A l’inverse, les implantations intramusculaires chez le rat n’ont donné lieu à **aucune réaction inflammatoire chronique**.

En parallèle, nous avons montré *ex vivo* qu’il était **possible d’utiliser un revêtement de Dex-PBMA pour libérer une molécule active**. Les tests ont été réalisés avec une molécule modèle et il en résulte une libération rapide. Les mises au point de la cinétique de libération seront nécessaires par la suite. En effet, en fonction des résultats obtenus *in vivo*, des cibles seront définies et une molécule pourra être choisie afin d’accroître

l'efficacité des Dex-PBMA stents. De plus il faudra s'assurer de la stabilité du principe actif dans le polymère afin de garantir son activité lors de la libération.

L'efficacité du revêtement de stent a pour finir été évalué *in vivo*. *In situ*, la pose de Dex-PBMA stent dans l'aorte abdominale a engendré **une faible hyperplasie neointimale** et après 30 jours, un **endothélium** tapissait la lumière. Les premiers résultats d'implantation de Dex-PBMA stent, libérant ou non du tacrolimus, dans l'artère iliaque du lapin sont positifs : la technique est au point. Il faut maintenant poursuivre ces implantations sur un plus grand nombre d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiques.

Le Dex-PBMA remplit donc plusieurs conditions du cahier des charges exigé pour un DMI notamment un revêtement de stent, ce qui confère à ce matériau un réel potentiel dans le domaine cardio-vasculaire. Cependant, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de valider le stade pré-clinique et de passer à la phase clinique. Particulièrement, la synthèse devra être reproduite dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication (GMP, Good Manufacturing Practices) et ces résultats devront être confirmés. Outre les tests d'implantation dans le modèle de resténose lapin et ceux de libération de principes actifs à poursuivre, une meilleure définition du matériau est nécessaire. La mixité de son solvant – THF/H₂O – est une limitation à de nombreuses études, et la présence de THF complique souvent la réalisation des expériences du fait de l'impact de ce solvant sur la majorité des supports polymériques. Ce dernier élément a d'ailleurs fréquemment été un challenge au cours de mon travail de thèse.

Une modification de la méthode de recouvrement des stents, par exemple l'utilisation d'une technique de spray à la place du trempage, aiderait probablement à une meilleure reproductibilité et gestion d'épaisseur du revêtement. Le passage d'une synthèse à plus grande échelle requerra vraisemblablement des adaptations, notamment afin d'obtenir un meilleur rendement et donc diminuer le coût de production. Enfin la question de la stabilité à long terme – plus de 7 jours - du revêtement de Dex-PBMA et l'impact d'éventuels débris *in vivo* restent à déterminer.

Néanmoins, il s'agit de la suite logique de l'évaluation d'un nouveau biomatériau. Les résultats d'ores et déjà obtenus avec le Dex-PBMA nous permettent de mieux connaître les propriétés et le fonctionnement de ce matériau. Ses propriétés antibactériennes et la possibilité de l'utiliser comme plateforme de distribution nous incite à élargir son champ d'utilisation et à envisager d'autres applications. Le Dex-PBMA pourrait améliorer l'intégration des endoprothèses valvulaires aortiques ou être utilisé pour le revêtement des chambres d'injection de chimiothérapie car la thrombose du cathéter central et l'infection font parties des complications.¹⁸⁶

CHAPITRE

4

**VALORISATION DES
TRAVAUX DE THÈSE**

1. Publication

Version provisoire de l'article qui va être soumis à ACS Applied Materials & Interfaces

In vitro and *in vivo* evaluation of a new dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on CoCr metallic stent.

Cécilia Delattre¹, Diego Velasque¹, Caroline Roques¹, Véronique Ollivier¹, Anna Lokajczyk², Thierry Avramoglou¹, Graciela Pavon-Djavid¹, Marie Bensussan¹, Liliane Louedec¹, Martine Jandrot-Perrus¹, Didier Letourneur¹, Catherine Boisson-Vidal² and Anne Meddahi-Pellé¹

1- INSERM, UMRS1148, Laboratory for Vascular Translational Sciences, Université Paris 13, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité

2- INSERM UMRS1140, Innovatives therapeutics in Hemostasis, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris

ABSTRACT

The purpose of this work was to study the biocompatibility and the durability of a dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on cobalt chromium metallic stent *in vitro* then *in vivo* in a rabbit model of restenosis. After synthesis and coating of Dex PBMA onto stent surface, Dex PBMA was characterized by contact angle measurement and the evaluation of its resistance under flow. Results showed the hydrophobicity of Dex PBMA and the resistance of the coating under flow. Haemocompatibility was evaluated by platelet adhesion in static and dynamic condition and thrombin generation and bacterial adhesion was performed on Dex PBMA. *In vitro*, human platelet adhesion and thrombin generation on Dex PBMA were moderate, bacterial adhesion was low and that human endothelial progenitors and mesenchymal stem cell adhesion and proliferation doesn't exhibited toxic effect. The Dex PBMA was then evaluated as a drug delivery platform. *Ex vivo* under flow, Tacrolimus release from coated Dex PBMA stent was rapid. Finally *in vivo* evaluation in rat and pathological rabbit models were performed and showed no evidence for necrosis or inflammatory reaction after intramuscular implantation of these stents. Besides in rat abdominal aorta model of stenting, intimal hyperplasia was moderate and an endothelium was present 30 days after stent implantation. In conclusion, these data demonstrate that the dextran-polybutylmethacrylate copolymer new coating improves the biocompatibility of the coated stent and represents thus a promising material for vascular stents and stent coating.

ABBREVIATIONS: BMA, butyl methacrylate; DES, Drug eluting stent; Dex-PBMA, Dextran-PBMA copolymer; ECFC, Endothelial colony-forming cell; LST, Late stent thrombosis; MSC, Mesenchymal stem cell; PBMA, Poly butyl methacrylate; PPP, Platelet poor plasma; PRP, Platelet rich plasma; SMC, Smooth muscle cell; TAC, Tacrolimus; THF, Tetrahydrofuran; VI, Velocity index of thrombin generation

KEYWORDS: Stent, Medical Devices, Polybutylmethacrylate, Dextran, Biocompatibility, Hemocompatibility

1 INTRODUCTION

Currently percutaneous transluminal coronary angioplasty following stent implantation is the first technique of revascularisation. Despite the development of new coronary stent technologies, interactions of blood and cells with the implanted devices may represent an important cause of side effects. The major complications of stents are restenosis and late stent thrombosis (LST). In-stent restenosis results from the proliferation of smooth muscle cells (SMCs).⁴ Late thrombus formation mechanism isn't fully explained yet, nevertheless it is thought to be associated with premature cessation of antiplatelet therapy,¹¹ a stent malapposition,¹² a late re-endothelialisation of the stent struts¹³ and the nature of polymer coating.¹⁴ In this context three coating strategies were developed to design safer drug eluting stent (DES).³ The first one is polymer free coating. Stent surfaces are micro-porous or contained cavities where drugs are loaded.¹⁵⁻¹⁶ The second one consists of a biodegradable polymer coating that allows the drugs delivery during the degradation of the polymer.¹⁶⁻¹⁷ In this case the polymer and its degradations products have to be biocompatible and not trigger inflammatory reaction. Many biodegradable coating were investigated.¹⁸ Nevertheless, side-effects such as inflammatory reactions related to their degradation products have been reported.¹⁸ The third one is based on a non-degradable polymer that protects the stent from corrosion. *In vitro* metallic stent backbone was shown to release degradation products which can lead to allergic reaction or sensitisation.¹⁹ The polymer must be biocompatible and should promote endothelial coverage to prevent adverse reaction.¹³ Recent studies suggest that the more rapid the re-endothelialization of the stented area, the lower the risk of inflammation and subsequent thrombus formation are.²⁰ The drug action and the polymeric coating materials themselves may inhibit the growth of endothelial cells, leading to disturbed vascular healing.²¹ In this context, it was stated that the stent platform, the drug and the polymeric drug carrier are all targets for DES improvement.²⁰

Polymethacrylate polymers are widely use in medical devices for their mechanical properties and particularly the poly(*n*-butyl methacrylate)

(PBMA) on several DES²². Nonetheless, it is always associated with another polymer because alone, its elasticity is too low to resist to stent deformation.²²⁻²³ To improve the mechanical properties and biocompatibility of PBMA-coated stent, we choose to associate a natural polysaccharide, the dextran. Previous works have demonstrated that a copolymer of dextran and PBMA (Dex-PBMA) (89:11 w/w) exhibits elastic properties suitable for stent coating.²⁴ Besides, dextran is non-toxic, the American Food and Drug Administration has already approved its use in clinic.²⁵ We previously showed that Dex-PBMA film promotes *in vitro* the growth of endothelial cell compare to PBMA alone and inhibits the SMCs proliferation.²⁴

In this study, we evaluated the biocompatibility of Dex-PBMA non-degradable stent coating (Figure 1). We first investigated *in vitro* interactions with blood components and also circulating cells involved in re-endothelialization of the stent surface. Then, we evaluated *ex vivo* the possibility to potentiate Dex-PBMA coating as a drug delivery platform with a model molecule, Tacrolimus. To finish Dex-PBMA was investigated *in vivo*, firstly to observe the foreign body reaction, then *in situ* in a rat abdominal aorta model of stenting and in a rabbit model of restenosis.

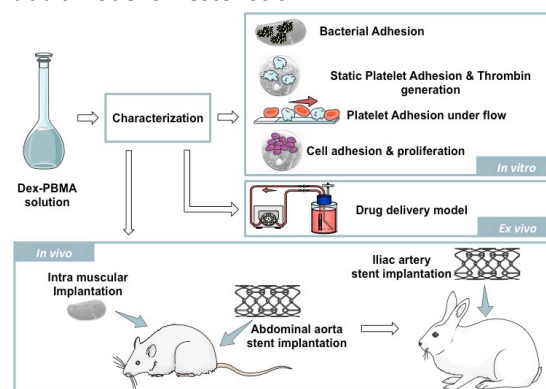


Figure 1. Schematic illustration of the subsequent steps of the stents coating process and the evaluation of their biocompatibility.

In vitro, *ex vivo* and *in vivo* evaluation of Dex-PBMA.

2 EXPERIMENTAL SECTION

2.1 Materials

Dextran (70 kg.mol⁻¹) was obtained from SIGMA. Butyl methacrylate (BMA) monomers were obtained from Acros France and were purified by washing with NaOH (5%), NaCl (20%), followed three times by distilled water. Ceric ammonium

nitrate and nitric acid were obtained from Acros. FK-506 monohydrate (Tacrolimus TAC) was purchased from SIGMA and was used as received. The coating was performed on electropolished CoCr disks (L615) 5 mm in diameter and 0.5 mm thick and onto CoCr stents (Abbott, USA).

2.2 Synthesis and characterisation of Dex-PBMA

2.2.1 Synthesis of the Dex-PBMA copolymer

The Dextran-PBMA copolymer (Dex-PBMA) synthesis was adapted from Derkaoui *et al.*²⁴ Briefly, the reactions were carried out in a 1 L five-neck flask equipped with stirrer and condenser. The flask was immersed into a thermostated oil bath at 40°C and purged by nitrogen gas. Then 0.125 g of dextran were dissolved in 500 mL of 0.2 M HNO₃ for 10 min. Then 5 mL of solution of ceric ammonium nitrate dissolved in 0.2 M HNO₃ (2.4×10^{-4} mol/L) and 2 g of BMA monomers were simultaneously added. After 40 min agitation, the pH was adjusted to 8 by the addition of 10 M NaOH aqueous solution and the solution was then concentrated in a rotavapor. The Dex-PBMA was precipitated in methanol and washed with 50 mL EDTA (10^{-2} M) to remove cerium, then lyophilized. To remove free PBMA homopolymer, the resulting product was extracted in acetone in a continuous extraction system (Soxhlet) for 6 h, lyophilized and the Dex-PBMA powder was stored at room temperature.

2.2.2 Dex-PBMA coating and Dex-PBMA film preparation.

Then Dex-PBMA polymer were coated either on glass-coverslips, CoCr discs or CoCr stents, or prepared as film. For that purpose, Dex-PBMA was dissolved in tetrahydrofuran (THF) and H₂O at a ratio of 92:8 (v/v). Then 50 µL on CoCr disc and 1000 µL glass coverslip coating of a 30% (w/v) copolymer solution was loaded at the surface and left to evaporation 24 h at room temperature in a saturated atmosphere of THF in the presence of CaCl₂ to absorb water After drying (24 h 37°C) and UV sterilization, coated disc (Dex-PBMA disc) or coated-glass coverslip were rinsed with phosphate buffered saline solution (PBS).

The stents, after deployment were dip-coated by immersion in a 20% (w/v) copolymer solution, evaporated in the presence of THF and CaCl₂, dried 24 h at 37°C, UV sterilized and then washed in

saline solution (NaCl 0.9%). The Dex-PBMA-coated stents (Dex-PBMA stent) were mounted over a balloon and hand-crimped.

For film preparation, 1.5 mL of 30% (w/v) of copolymers solution was poured into a 15 mm diameter Petri dishes. After solvent evaporation, drying and sterilization were performed in the same experimental conditions as described above. An 8 mm diameter circular punch (Harris, Uni-Core) was used to obtain a round-shaped films. Dex-PBMA films were washed in NaCl 0.9%.

For disc and stent associated with tacrolimus (Dex-PBMA_{TAC} disc or stent), TAC (1 mg/mL) was dissolved in THF/water solution before Dex-PBMA in order to obtain Dex-PBMA_{TAC} solution. Then, disc or stent were coated using the same way as Dex-PBMA disc or stent.

2.2.3 Dex-PBMA coating resistance under flow

The coating resistance of Dex-PBMA stent was evaluated *in vitro* under dynamic conditions. For that purpose, Dex-PBMA stents (internal expanded diameter 4 mm, 8 mm long) were expanded in a silicon tube (4 mm in internal diameter, Versilic®) and submitted to a coronary-physiological flow (shear rate 1000 s^{-1}) in water at 37°C. During the same time-course experiment, Dex-PBMA stents were left in static condition (water, 37°C). After 7 days, samples were metalized with 5 nm of gold and observed using an environmental scanning electron microscopy (ESEM, XL30 ESEM-FEG Philips) with an accelerating voltage of 20 kV at Hivac.

2.2.4 Water contact angle analysis

Contact angles were evaluated using the sessile drop method (DSA 10 Kruss Instrument). A 1 µL water droplets was dispensed on the surface, and the contact angle determination for each sample was the average value of ten measurements on different parts of the samples: CoCr discs, Dex-PBMA discs and Dex-PBMA_{TAC} discs.

2.3 Platelets adhesion and thrombin generation on Dex-PBMA

Because, once deployed in the artery, stent is in contact with blood components, we evaluated the impact of Dex-PBMA on the coagulation pathway. Platelet adhesion was evaluated as reflect of primary hemostasis either in static or dynamic conditions. A larger view of coagulation pathway was investigated by the quantification of thrombin

generation. All experiments were carried out with fresh peripheral blood mononuclear cells collected from healthy donors provided by the French blood bank institute (EFS) under an agreement with the INSERM U1148 (n°12/EFS/079).

2.3.1 Static platelet adhesion on Dex-PBMA

Static evaluation of platelets adhesion was carried out on human washed platelets suspension. Whole blood collected into vacuum blood-collection tubes (Vacutainer™ system, Beckton Dickinson), containing trisodium citrate acid-citric-dextrose (ACD-A) was centrifuged at 200 g for 15 min at room temperature (RT) to harvest platelet rich plasma (PRP). Then ACD-A (1/10 v:v), Apyrase (2/1000 v:v) and prostaglandin E1 (PGE1) (1/1000 v:v) were added to PRP and this suspension was centrifuged at 1,200 g for 12 min at RT. The pellet containing platelets was washed in washing buffer (pH 6.5, citric acid 3.6 mM, Glucose 0.5 mM, KCl 0.5 mM, MgCl₂ 0.1 mM, NaCl 10.3 mM, CaCl₂ 2 mM, BSA 3.5 mg/mL, Apyrase 2 μl/ml, PGE1 0.1 mM) and resuspended in reaction buffer (RB) (pH 7.3, NaCl 13.7 mM, KCl 0.1 mM, MgCl₂ 0.2 mM, Glucose 0.55 mM, HEPES 0.5 mM, NaH₂PO₄ 30 μM, NaHCO₃ 0.12 mM, BSA 3 mg/mL) to reach a concentration of 2x10⁸ platelets/mL and incubated in RB at RT for 10 min prior to their use.

Dex-PBMA or CoCr disks were loaded into a 96 wells plate. Wells were coated respectively with 100 μL of 10 mg/mL of collagen I solution (positive control of platelet adhesion) incubated 12 h at 4°C or with 150 μL of bovine serum albumin (BSA) 1% (w:v) in PBS (negative control of platelet adhesion) 2 h at RT. Purified platelets suspension (100 μL) were added into the 96 wells plate, incubated (1 h, RT) on a platform shaker and washed two times with the RB solution. Then, 100 μL of lysis solution (Na citrate 0.1 M, PNP 1.3 mg/ml, triton X-100 20 μL/ml) were added. After 1h30 incubation at 37°C, the reaction was stopped with 25 μL of 1 M NaOH solution and supernatants were read at 405 nm (Fluostar optima, BMG Labtech). Each experiment was carried in three times and readings were made in duplicate. In order to observe the platelet morphology, Dex-PBMA or CoCr discs were fixed in 2.5% glutaraldehyde solution for 1 h, dehydrated in ethanol and observed with

Environmental Scanning Electron Microscopy (ESEM, XL30 ESEM-FEG Philips).

2.3.2 Dynamic platelet adhesion on Dex-PBMA

Dynamic evaluation of platelet adhesion was carried out on whole blood. Blood was collected via atraumatic antecubital venipuncture into PPACK tubes (Calbiochem). Dioc-6 (10 μM, Interchim®) labeled platelets were perfused in whole blood over Dex-PBMA or collagen-coated glass coverslip for 2 min at a shear rate of 1500 s⁻¹ at RT. Adherent platelets were examined by phase-contrast microscopy. All experiments were observed in real-time and videotaped for offline analysis. Quantification of fluorescence measurements within time (t) was processed from digital images with ImageJ software using the t0 image as the zero reference.

2.3.3 Thrombin Generation on Dex-PBMA

Thrombin generation was carried out on PRP or platelet poor plasma (PPP) as previously described.²⁶ Blood was collected into citrated tubes (siliconized Vacutainer™ tubes, Becton Dickinson, Meyton, France), centrifuged at 200 g for 15 min at RT to isolate PRP. PRP platelet concentration was adjusted to 1.5x10⁸ platelets/mL by dilution with autologous PPP prepared by centrifugation of the remaining blood at 2,000 g for 15 min. Thrombin generation was measured in freshly prepared PRP and PPP using a Calibrated Automated Thrombogram. Dedicated software (Thrombinoscope®, Thrombinoscope BV, Maastricht, The Netherlands) enables the calculation of thrombin activity and displays thrombin activity against time. All experiments were carried out in triplicates. Results were expressed in proportion of a control Immulon 2hb well (Thermoscientific®, a material triggering low thrombin generation). Parameters of thrombin generation were as follows: lagtime corresponding to the time for thrombin generation to reach 10 nM (LT), the peak (maximum rate of thrombin formation), the time-to peak (tPeak) corresponding to the time to where the peak thrombin generation rate occurs and the velocity index (VI). VI = Peak / (tPeak-LT) (Figure 3C).

2.4 Cell adhesion and proliferation onto Dex-PBMA

2.4.1 Cell isolation and preparation

Human endothelial colony-forming cells (ECFCs) were isolated from human umbilical cord blood after mothers' consent obtention and approval by the ethic committee of the Hôpital d'Instruction des Armées de Begin (France) (authorization n° 201008043234797), and the protocol was conform to the ethical guidelines of Declaration of Helsinki. ECFCs were expanded in EGM2 and characterized as previously described.²⁷ The presence of Weibel-Palade bodies, combining the expression of endothelial markers (CD31, KDR, Tie-2, CD144), and dual positivity for DiI-AcLDL uptake and BS-1 lectin binding confirmed the endothelial phenotype of the ECFCs thus obtained. ECFCs do not express leukomonocytic markers such as CD45 and CD14. FACS analysis (FACS Calibur, Becton Dickinson) was used to assess expression of endothelial-lineage cell surface antigens²⁷. Cells were used with cells culture for less than 30 days.

Mesenchymal stem cells (MSCs) were isolated from bone marrow mononuclear cells collected from ficoll gradients and cultured in Minimum Essential Medium- α (Invitrogen, Cergy Pontoise, France), supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (HyClone, Logan, UT), Glutamax-I (2 mM; Invitrogen), FGF2 (1 ng/mL; R&D Systems, Lille, France) and antibiotic/antimycotic (1%, Invitrogen). Expression of transforming growth factor β receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients²⁸. Bone Marrow samples were obtained after informed consent according to approved institutional guidelines (Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France). Cells were used between passage 4 and 7.

2.4.2 Cell adhesion and proliferation

One day before experiments, ECFCs and MSCs were growth-arrested for 18 h respectively in EBM2, 2.5% Foetal Calf Serum (FCS) and MEM Glutamax. They were then washed, detached with accutase (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and suspended in appropriate medium. All assays were performed in triplicate. Dex-PBMA or CoCr discs were placed at the bottom of 96-well plates. As a positive control some wells were coated with gelatin 0.2% (30 μ L, 20 min at RT). All

samples were passivated with FCS (50 μ L, 20 min at 37°C).

For cell adhesion assay, ECFCs or MSCs cells were seeded onto disc at 25,000 cell/cm² in appropriate medium. The cells were incubated either for 20 min or 2 hours at 37°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. After washing the disc with PBS to remove non-adherent cells, cell adhesion quantification was made using PNP (Sigma), as explained for static platelet adhesion.

For cell proliferation assay, ECFCs or MSCs cells were seeded on each disc at 15,000 cell/cm² in appropriate medium. The cells were incubated for 4 days at 37°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. On day 3 and day 4, cell proliferation was evaluated by PNP assay.

In all assay, results were expressed as a ratio of gelatin control (n=3). Values are mean of plus or minus standard error of the mean (SEM) of three determinations.

2.5 Bacterial adhesion

Experimental procedures of the adhesion of *Staphylococcus aureus* CIP53136 (Pasteur Institute) on Dex-PBMA film, CoCr disc and collagen (positive control) were adapted from Anagnostou *et al.*²⁹ *S. aureus* was used because it's the main bacteria involved in stent infection³⁰.

First, samples were incubated 1h at 37°C in Foetal Calf Serum (FCS, Gibco). The samples were then washed with PBS and then incubated with 1 mL of a suspension of *S. aureus* 10⁸ colony forming units/ml concentration. After 1 h of incubation at 37°C, samples were washed three times with PBS and incubated with 500 μ L of trypsin. The removed bacteria were then spread on agar gel and cultivated overnight. The day after colony on agar gel were counted.

2.6 Pharmacological drug-release through Dex-PBMA

Dynamic perfusion systems were developed in order to study release of a model molecule from the Dex-PBMA. The chosen molecule was Tacrolimus (TAC). The circulation system was a flask containing perfusion medium - Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM Invitrogen) supplemented with sodium bicarbonate L-glutamine (2 mM, Invitrogen), penicillin/streptomycin (10 ml/L, Gibco) and FCS (10% Gibco) connected to a peristaltic pump

(MasterflexL/S) and maintained at 37°C in which one a stented artery was introduced. A physiological rate flow was then applied on the system (shear rate 1000 s⁻¹) and 0.2 µm sterile filters allow gas exchange. Arteries were removed from male Wistar rats (200-250 g, 8 week-old, CERJ, France) and cut in segments 5–7 cm length. A Dex-PBMA or Dex-PBMA_{TAC} stent was then expanded into them (2.5 mm in diameter) and the arteries were placed into the circulating *ex vivo* system. 1/500th of the perfusion medium was taken every day during 6 days. A specific assay was developed to quantify the concentration of TAC released in the collected samples using an immunoaffinity bead-based flow cytometric test and the xMAP[®] technologies. The use of multiplex immunoassays is expanding in both basic and applied research³¹ and enables the quantification of several parameters of low concentration in small volume. Sheep polyclonal anti-TAC (New Biotech) was covalently coupled to the fluorescent color-coded beads (BDTM Cytometric Bead Array). Before the assay and to control the bead grafting, the beads were incubated with a secondary fluorescent antibody (Rabbit anti-Sheep-FITC, Pierce). In order to determine TAC concentration, samples were mixed with the previously grafted beads and kept in the dark (2 h, RT). The captured TAC was detected using specific biotinylated anti-tacrolimus secondary antibody (HyTest LTD). After wash, Streptavidin-Phycoerythrin (PE) detection reagent was incubated with capture bead in the dark (15 min, RT). Acquisition was achieved on BD FACS array bio-analyzer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA). The intensity of fluorescence of yellow parameter (PE emits at 585 nm) is proportional to the amount of TAC present in samples. Standard curves of TAC (range 48-25,000 pg/ml) were run in each assay.

2.7 Dex-PBMA *in vivo* implantation

The procedures and the animal care complied with the « Principles of animal care » formulated by the European Union (Animal Facility Agreement n°75-18-03, 2005) and protocol was approved by the ethical committee (authorization n°75–214, French Ministry of Agriculture).

2.7.1 Rat intramuscular and intra-aortic implantations

Twelve healthy male Wistar rats (9 to 11 week-old, CERJ, France) were used for the study. The rats were sedated before and during each manipulation with Pentobarbital (0.1% v/w).

Intramuscular implantation test. Foreign body reaction to Dex-PBMA was first evaluated by intramuscular implantation. Dex-PBMA films were implanted in the abdominal wall of 9-weeks-old male Wistar rats and harvested after 7, 15 and 30 days. After 48h of immersion fixation with 4% formalin, tissues were embedded with paraffin. Section of 6 µm thickness were cut (Microm HM) from the middle part of the film. Subsequently, sections were deparaffined and stained with hematoxylin-eosin (HE) and Naphthol AS-D Chloroacetate esterase stains. The thickness of the cell cap was measured 5 times on HE histological sections, 3 sections by rats (n=3), using the soft NDP view (Hamamatsu) after scans by nanozoomer (Hamamatsu).

Intra-aortic implantation test. Secondly, Dex-PBMA stent coating was then evaluating. 11-weeks-old male Wistar rats received a standard diet and aspirin in water (1 mg/mL) 72 h before implantation to sacrifice. 2.25 mm-diameter 8-mm-long stent was implanted trough an abdominal aorta access. After a flush of the aorta with 200 U heparin, rats were sutured in 3 times (aorta, muscles, skin). An angiography was made after 30 days to ensure that the stent hadn't move immediately followed by sacrifice. Stented aortas were then harvested, fixed 72 h with 4% formalin and methyl methacrylate-embedded (MMA from Sigma) protocol adapted from Rippstein *et al.*³² Section of 10 µm thickness were cut (Microm HM) from the middle part of the film. Subsequently, sections were deplastified and stained with HE or immune-stained with alpha actine, RECA (endothelial cells) and CD-68 (macrophages).

2.7.2 Implantation in a rabbit model of intimal hyperplasia

The protocol was adapted from Feldman *et al.*³³ Three male New Zealand White Rabbits, weighing 3.5 to 4.7 kg, were fed a 0.3% cholesterol diet, started 21 days before angioplasty. Animals were anesthetized with intramuscular ketamin 500 U, Xylazine and Vetranquil (14:8:4 v/v). All animals

received heparin (1000 U) within the carotid before angioplasty. A 5F sheath was inserted in the left carotid artery. Intimal hyperplasia was induced by balloon angioplasty followed by stent implantation. Bilateral iliac artery angioplasty was performed with a 2.5-mm-diameter, 20-mm-long angioplasty balloon catheter (3 times 1-minute inflation at 8 atm). A 8-mm-long and 2.75 mm in diameter coated stent mounted over the balloon, was implanted in both iliac arteries immediately after balloon angioplasty (30-second inflation at 10 atm), resulting in frank arterial overstretch (1.2 to 1.3 stent-to-artery ratio). Arterial blood was drawn before angioplasty and at euthanasia. The concentration in TNF- α was evaluated using Elabscience rabbit TNF- α ELISA Kit to study the effect Dex-PBMA or Dex-PBMA_{TAC} on TNF- α .

2.7.3 Morphometric analyses of restenosis

According to Feldman *et al.*³³, morphometric analyses were performed using the soft NDP view (Hamamatsu) after scans by Nanozoomer (Hamamatsu). Measurement of the luminal area as well as two areas bounded by the internal and external elastic lamina on HE staining served to compute intimal and media areas. Three indexes of intimal growth were used: intimal area, media area and the ratio between these last ones. This experiment was carried out on rat and rabbit stented arteries.

2.8 Statistical analysis

Each experiment was carried in triplicate at least. Data are presented as mean \pm standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni's post hoc test was used to examine the significance of results between groups if their number were higher than 2 otherwise t-test were used. A value of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

3 RESULTS

3.1 Dex-PBMA characterization

The synthesis leads to a homogeneous white powder of dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer (Dex-PBMA) soluble in a mixture of THF and water (92:8 v/v). The different coatings or molding resulted in a transparent film, homogeneous and without cracks. Dex-PBMA deep-coating of stent result in an independent coating of covered each strut independently with

very few links between them. The stent surface modifications were studied using SEM and contact-angle analysis. As shown Figure 2 by SEM micrographs of the control in static conditions, this coating resisted to the crimping on the balloon and the deployment. Figure 2A shows SEM images of the coated stent after one week of incubation in water at 37°C and under coronary-like flow conditions. The Dex-PBMA coating remained unaltered and showed a uniform polymer surface, no peeling and delamination were observed.

The wettability of the coatings was evaluated by measuring water contact angles. No significant differences were noticed between the three surfaces CoCr, Dex-PBMA or Dex-PBMA_{TAC} discs (Figure 2B). Nevertheless CoCr is less hydrophobic ($\theta = 88.7^\circ \pm 2.2$) than Dex-PBMA with or without TAC surfaces (respectively $\theta = 98.5^\circ \pm 0.4$ and $99^\circ \pm 2.9$, $p = 0.0078$).

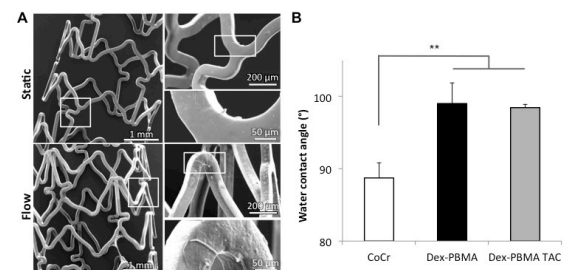


Figure 2. Dex-PBMA characterization.

(A) SEM micrographs of dextran grafted poly(butyl methacrylate) (Dex-PBMA) coated stent. Stents were expanded, dip-coated, crimped on a balloon and expanded again. They spend 8 days in water either in static or under flow conditions, shear rate 1000 s^{-1} . (B) Water contact angles on cobalt chrome (CoCr), Dex-PBMA or Dex-PBMA with tacrolimus (Dex-PBMA_{TAC}) discs. Values are mean \pm SEM of ten determinations.

3.2 Bacterial adhesion

Even if it deals with rare events, several cases of stent infection were reported. This complication is associated with a high risk of morbidity and mortality³⁰ that's why Dex-PBMA bacterial adhesion was assessed. As shown on Figure 3, the bacterial adhesion on Dex-PBMA was lower than on CoCr (ratio 11, $p = 0.0011$) and control collagen (ratio 4.49, $p = 0.0163$). In contrast, more bacteria adhered on CoCr than on control (ratio 4.67, $p = 0.0024$). The CoCr electropolishing - process often uses for clinic stents surfaces preparations - could explain this high adhesion. Indeed, *staphylococcus aureus* adhesion depends of proteins adsorption and surface roughness³⁴ and micro-scratch providing favorable places for bacteria.

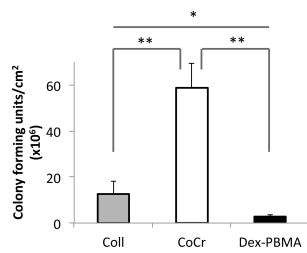


Figure 3. Bacterial adhesion on Dex-PBMA. *Staphylococcus aureus* adhesion on Dex-PBMA film, CoCr disc and Collagen after 1h incubation at 37°.

3.3 Platelets adhesion and thrombin generation on Dex-PBMA.

On its luminal surface, stents are in contact with blood. To prevent thrombus formation, the hemocompatibility of the coating needs to be assessed. First we evaluate the interaction between Dex-PBMA, CoCr and platelet in particular their adhesion under static and flow conditions.

As shown on Figure 4A, in static condition less platelet adhered on Dex-PBMA than on the positive control collagen (ratio 2.7, $p < 0.0001$) or CoCr ($51.01 \pm 15.18\%$ vs $36.67 \pm 14.64\%$ of the positive control, $p = 0.0613$). Although this difference is not significant, this trend is observed on SEM micrographs. The level of platelet activation might be lower on the copolymer than on the bare metal. Indeed, non-activated platelets are disk-shaped. Once activated, platelets first take a spherical shape as observed on Dex-PBMA disk (Figure 4A) before spreading and giving out extension such as filopodia that can be observed on CoCr surface.³⁵ A dynamic model was used to simulate the shear forces encountered by the platelets *in vivo*, when they adhered to the stent. In these dynamic conditions, no platelet adhered to Dex-PBMA (Figure 4B). Thus, this coating does not promote platelet adhesion and activation.

Thrombin generation was performed on Dex-PBMA and CoCr. Velocity index of thrombin generated in presence of tissue factor (TF) and with platelet poor plasma (PPP) was 1.9 lower on Dex-PBMA disc than on CoCr disc (Figure 4C, $p = 0.0058$). There were no differences between the two surfaces on thrombin generation when the test was performed in PPP without TF (Figure 4C) or in platelet rich plasma with or without TF (data not shown). A Dex-PBMA coating, by limiting platelet adhesion and triggering a moderate thrombin generation, limits the risk of thrombosis.

3.4 Cells adhesion and proliferation onto Dex-PBMA

The stent is also in contact with the circulating cells. Interactions between Dex-PBMA and ECFCs were investigated. MSCs were also used to evaluate the potential of cell adhesion on Dex-PBMA.

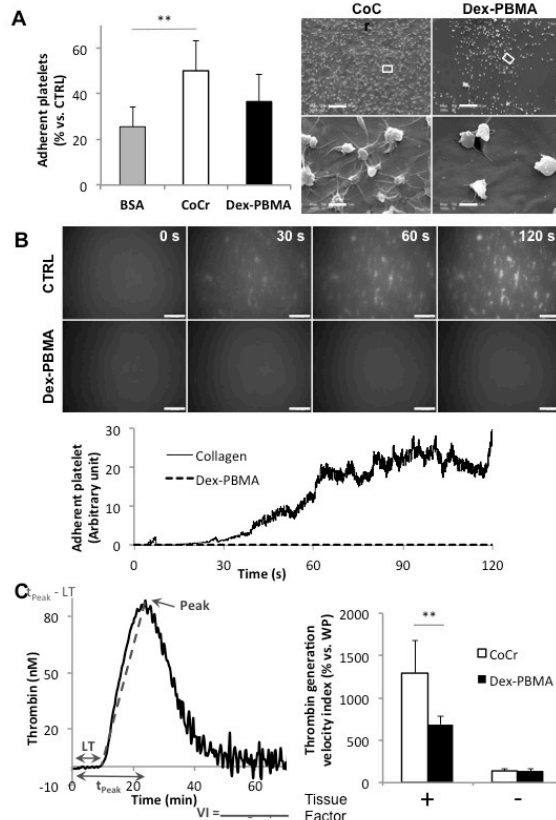


Figure 4. Human platelet adhesion and thrombin generation onto Dex-PBMA.

(A) Left panel: Platelet adhesion in static condition on Dex-PBMA or CoCr discs and bovine serum albumin (BSA, negative control). Quantification of adherent platelets after 2h incubation at room temperature. Data are expressed as a percentage of adherent platelets on collagen (positive control, CTRL). Values are mean \pm SEM of three determinations. $^{***}p < 0.01$. Right panel: Environmental scanning electron micrographs of adherent platelets on Dex-PBMA and collagen. Scale bar 20 μ m, higher magnification scale bar 2 μ m.

(B) Up: Dynamic adhesion of dioc-6 labeled platelets on Dex-PBMA and collagen (CTRL) coated glass-coverslips submitted to physiological flow (shear rate 1500 s^{-1}). Micrographs of adherent platelets after 0, 30, 60 and 120 s. Down: Quantification of the adhesion within times on Dex-PBMA and collagen.

(C) Thrombin generation on Dex-PBMA and CoCr discs. Left panel: Representative curve obtained after a thrombin generation experiment. Right panel: Lagtime (LT), time to peak (t_{Peak}) and velocity index (VI): the slope of line joining the LT to the Peak. Right panel: Velocity Index of PPP with 1 pM or without tissue factor 1 pM on Dex-PBMA and CoCr. Data are expressed as a percentage of the results on well plate (WP). Values are mean \pm SEM of six determinations. $^{**}p < 0.01$.

ECFCs and MSCs adhered less on Dex-PBMA disc than on CoCr disc. Non-significant differences were noticed for intermediate adhesion (20 min incubation time) whereas for focal adhesion (2 h incubation time), there were 2.4 less adhered ECFCs (Figure 5A, $p=0.0002$) and 1.6 less adhered MSCs (Figure 5B, $p=0.0299$) on Dex-PBMA compared to CoCr discs. The same trends were observed for cells proliferation (Figures 5C and D). Proliferation of ECFC and MSC on CoCr disc is greater than on Dex-PBMA. In both cellular type and surfaces the proportion of cell compared to control coating of gelatin decrease after 4 days. CoCr or Dex-PBMA surfaces causes cell to grow more slowly than on control. *In vitro* the surface seems to be neutral but it has to be confirmed *in vivo*. Indeed, the passivation by plasma proteins modifies the surface and could change the results.

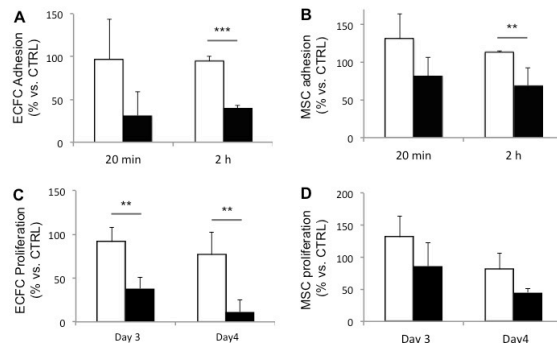


Figure 5. Circulating cells adhesion and proliferation on Dex-PBMA.

(A-B) Human endothelial colony-forming cells (ECFCs) (A) and mesenchymal stem cells (MSCs) (B) intermediate (20 min) and focal (2 h) adhesion on Dex-PBMA (■) and CoCr (□) discs. (C-D) ECFCs (C) and MSCs (D) proliferation after 72h and 96h of culture. Data are expressed as a percentage of the positive control (CTRL): gelatin. Values are mean \pm SEM of three determinations. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

3.5 Release of Tacrolimus from Dex-PBMA.

Dex-PBMA already provide adapted results to stent coating, nevertheless it may be possible to transform this inert coating in an active one by including a drug. Therefore, Tacrolimus (TAC) was chosen as a drug model to demonstrate the feasibility to use Dex-PBMA as a delivery platform. Stents were deep-coated in a solution of Dex-PBMA and TAC (1 mg/mL) for a single layer coating. Figure 6 shows the cumulative TAC release profile from *ex vivo* stented arteries. The release period was taken from 1 to 107 h. A burst release was observed corresponding to 5 ng/mL (50%) after 3 h, followed by a reduced release profile reaching 10 ng/mL after 96 h.

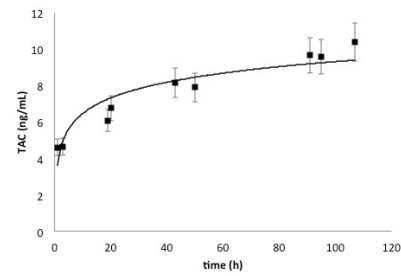


Figure 6. *Ex vivo* cumulative Tacrolimus release profile from rat abdominal aorta stented with Dex-PBMA_{TAC} stent for a period of 2 hours, in perfusion medium at 37°C under flow conditions (shear rate 1000 s⁻¹).

3.6 Dex-PBMA in vivo implantation

3.6.1 Rat intramuscular and intra-aortic implantations

The Dex-PBMA films were first implanted in rat abdominal wall to evaluate the absence of any triggered pathological tissue reactions. Figure 7 shows the results 7 and 30 days following Dex-PBMA film implantation. As shown on HE staining (Figure 7A), a tissue surrounded the film at day 7 with a thickness of 40 \pm 12 μ m and kept stable at day 30 (47 \pm 12 μ m). No neutrophil granulocytes were detected in the tissue as observed Figure 7B by a low level of Naphtol AS-D Chloroacetate staining. The capsule is thus mainly composed by collagen without any evidence of inflammatory reaction or necrosis.

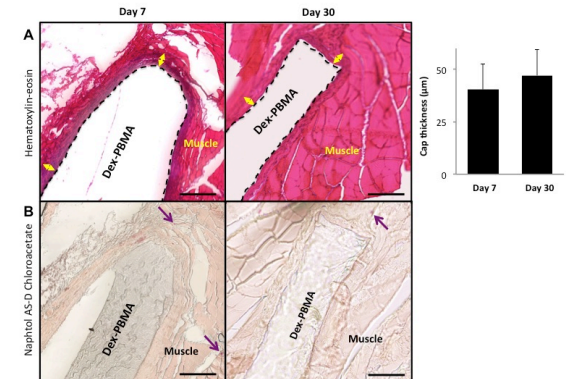


Figure 7. Histopathologic evaluation for tissue biocompatibility of surrounding tissues after Dex-PBMA intramuscular implantation at 7 and 30 days.

(A) Representative photos of hematoxylin-eosin stainings (left panel). Double arrows represent cell cap. Evolution of the thickness of the cell capsule within time (right panel). Value are mean \pm SEM of three determinations. (B) Granulocytic lineage labeled by naphtol AS-D Chloroacetate esterase staining in purple (arrow). Scale bar 100 μ m.

Dex-PBMA was then evaluated *in situ* in stenting of rat abdominal aorta. Immediately after implantation no thrombosis were observed. After 30 days all Dex-PBMA or CoCr stent implanted rats (n=6) survived. Angiographies at day 30 confirmed

that all arteries were permeable (data not shown). As shown in Figure 8, no thrombus was found in Dex-PBMA or CoCr stented arteries. Nevertheless, a small intimal hyperplasia was observed both on Dex-PBMA and CoCr stents whereas no significant difference in the areas of intima ($0.54 \pm 0.007 \text{ mm}^2$ vs. $0.50 \pm 0.06 \text{ mm}^2$) and media ($0.40 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ vs. $0.43 \pm 0.02 \text{ mm}^2$) on CoCr stent and Dex-PBMA stent was noticed. No macrophages were emphasized in the arterial wall (CD 68 staining, Figure 8B). The neointima was mainly composed of SMCs (α -actin staining). Moreover, this SMC layer was covered by an endothelial layer (RECA staining) on Dex-PBMA as well on CoCr stents. As observed *in vitro* no platelets adhered on Dex-PBMA and lead to thrombus formation. Besides, reject reaction was observed neither from artery wall nor from blood container.

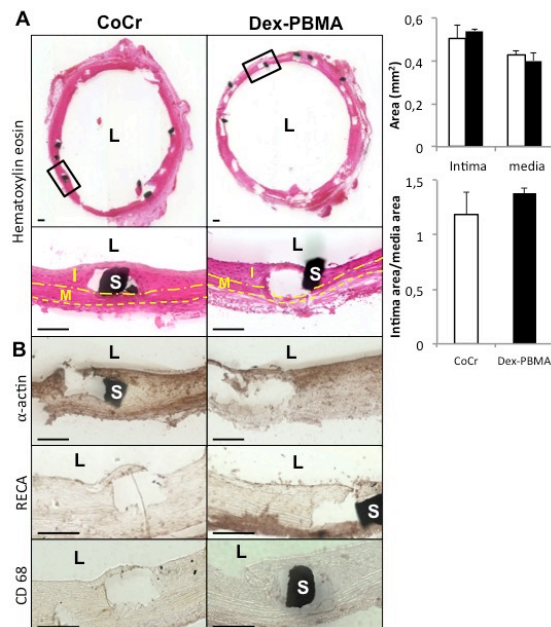


Figure 8. Dex-PBMA coated or bare CoCr stent implantation in rat abdominal aorta after 30 days. (A) Representative Hematoxylin-Eosin stainings (left panel). L indicates the lumen, I the intima delimited by the lumen and internal elastic lamina (_ _ _), M the media delimited by the internal and the external elastic lamina and S a strut of the stent. Quantification of intimal hyperplasia (right panel) on Dex-PBMA (■) and CoCr (□) stents. Comparison of areas of the intima and media and the ratio of these last ones. Values are mean \pm SEM of three determinations. (B) Representatives α -actine (smooth muscle cells), RECA (endothelial cells) and CD 68 (Macrophages) immuno stainings. In both cases, a layer of cell proliferated in lumen. It were formed by SMCs and no macrophages were evident. An endothelium was still present. Scale bar 100 μm .

3.6.2 Implantation in a rabbit model of intimal hyperplasia

Dex-PBMA or Dex-PBMA_{TAC} stents were evaluated in a pathological model of neointimal hyperplasia. All implanted rabbits survived after 30 days and iliac arteries were permeable. After hematoxylin-eosin staining, as expected, a neointima were observed (Figure 9A). The measurements emphasize a higher ratio of intima and media areas on Dex-PBMA stent than on CoCr stent (2.39 vs 1.90). Nevertheless, with Dex-PBMA_{TAC} this ratio decrease (1.60 vs 2.39). On the other hand, TNF- α blood concentration between before and 30 days after implantation increase in CoCr stent implanted rabbit (+15.6 pg/mL), almost keep stable for Dex-PBMA stent implanted rabbit (+0.53 pg/mL) and decrease for Dex-PBMA_{TAC} stent implanted rabbit (-4,87 pg/mL) (Figure 9B).

4 DISCUSSION

We aimed at investigate Dex-PBMA to use it as a cardiovascular stent coating. Firstly, the abilities to coat a stent and to resist to the implantation were evaluated. Each strut was homogeneously and independently coated, these results are comparable with commercial stents with few topographic disturbances.³⁶⁻³⁷ Besides, the copolymer resist under flow conditions. Stents being affected by blood flow, the stability of the coating is an important parameter because delamination, cracking or peeling could lead to polymer fragments in blood circulation and embolization.³⁸

Dextran and PBMA are already used in clinic and for stent coating.^{22, 25, 39} As several studies underlines the importance of a rapid reendothelialization of the stented area,²⁰ we investigated the cell adhesion and growth on the copolymer. HUVEC are often used for this kind of test.⁴⁰⁻⁴¹ However studies have shown that human transanastomotic endothelialization was limited⁴² and that endothelial progenitor cell from bone marrow promote endothelium formation⁴³ so circulating cells – ECFCs and MSCs - were investigated. Moreover, dextran is non-toxic and has been shown to favour the adhesion of progenitor endothelial cells.⁴⁴⁻⁴⁵ Despite this, the adhesion as well as the proliferation of both cellular types was low on Dex-PBMA. These results

could be explained by the high hydrophobicity of Dex-PBMA ($\theta=98.5^\circ$) as demonstrated with

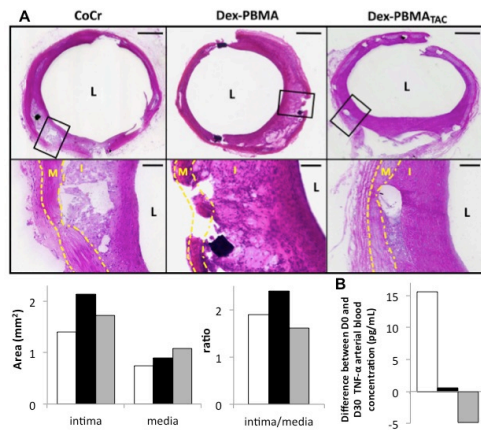


Figure 9. Dex-PBMA with or without Tacrolimus coated or bare CoCr stent implantation in rabbit iliac artery restenosis model after 30 days.

(A) Representative Hematoxylin-Eosin stainings (Up). L indicates the lumen, I the intima delimited by the lumen and internal elastic lamina (_ _ _) and M the media delimited by the internal and the external elastic laminae. Quantification of intimal hyperplasia (down) on Dex-PBMA (■) Dex-PBMA_{TAC} (▣) and CoCr (□) stents. Comparison of areas of the intima and media and the ratio of these last ones. (B) Difference of TNF- α arterial blood concentration between before stent implantation and 30 days letter before sacrifice.

fibroblast, a 90° contact angle surface decreases cell proliferation.⁴⁶ Nonetheless, these results are obtained *in vitro*; *in vivo* the adsorption of blood proteins can modify cell reaction⁴⁷ that's why a layer of endothelial is observed after 30 days of Dex-PBMA stent implantation in a rat model.

Then as stents are introduced through a transcutaneous way, the risk of bacterial infection exists and several lethal cases were described.³⁰ Even if it's a rare complication, the removal of the device is the preferred treatment and is not always possible due to its localization.³⁰ Thus we evaluate *staphylococcus aureus* adhesion to our copolymer. In methyl methacrylate family other component have shown their abilities to prevent bacterial adhesion.²⁹ Even if dextran was shown to favor bacterial adhesion,⁴⁸ its addition to PBMA doesn't seem to promote bacterial adhesion and Dex-PBMA seems to be able to prevent bacterial infection.

Stents are placed in blood flow, so their hemocompatibility is a major point to avoid thrombosis. Indeed, some polymeric materials as silicone rubbers have very poor blood compatibility and trigger thrombus formation.⁴⁹ Moreover hemocompatibility is a key point in regulations to go further in Dex-PBMA stent evaluation and to

reach the clinical state. Thus, static and dynamic platelet adhesion tests were carried on Dex-PBMA; in both conditions few platelets adhered on the surface. Besides, Dex-PBMA induce moderate thrombin generation tests - reflect of the influence of the material on coagulation.

To potentiate our coating material and increase its efficiency we investigate the possibility to use it as a drug delivery platform. The kinetics of Tacrolimus release followed the same profile as some release profile of commercial sirolimus eluting stents obtained *in vitro*.⁵⁰ TAC release depends on several parameters of the drug delivery platform and particularly the way the molecule is coated on the stent.⁵¹ In the case of Dex-PBMA_{TAC} stent, drug release profile corresponds to a fast release because 50% of drug is released after only 3h. In comparison 30 days are needed to the Tacrolimus-Eluting Janus CarboStent™ to release 50% of its drug.¹⁵ The release kinetic could be modulate by an addition of a polymer drug free layer as already describe with a methacrylate layer which slow down the elution with about a factor 2⁵² and thus increase the time of release. The amount of drug loaded in the copolymer could also be increased. Thus, Dex-PBMA can be used to release drug nevertheless release parameters need to be adjusted.

After these *in vitro* and *ex vivo* evaluations, the biocompatibility of Dex-PBMA needed to assess *in vivo*. Dex-PBMA was first implanted intramuscularly in rats to test its biocompatibility and the absence of inflammatory reaction, then *in situ* on stents in healthy aortas to check the absence of thrombosis or restenosis. To finish, Dex-PBMA stent efficiency was evaluated in rabbit iliac artery in-stent restenosis model.

The introduction of an exogenous part in the body trigger a more or less important inflammatory reaction which can lead to the encapsulation by fibrous tissue of the foreign body and giant cells formation.⁵³ Dex-PBMA intramuscular implantation entailed the formation of a capsule but no sign of inflammation was noticed. Besides the thickness of this caps was moderated : 47 μm vs. 600-1500 μm for silicone implants with PLGA or a TNF- β inhibitor coatings.⁵⁴ Nevertheless these results aren't directly comparable with our own because the

implant size and the implantation site were different.

Inflammatory reaction wasn't observed too in Dex-PBMA stent implantations; neither in rat aorta with the absence of esterase nor in rabbit with no increase in TNF- α (cytokine implicated in inflammation)⁵⁵ blood concentration. As observed in vitro, due to the law platelets adhesion no Dex-PBMA entailed a thrombus formation. Besides the intimal hyperplasia on Dex-PBMA stent was moderated and an endothelium was observed only 30 days after rat abdominal aorta stent implantation. The results in the rabbit model of neointima follow the same trend, hyperplasia on Dex-PBMA as well as Dex-PBMA_{TAC} stents were higher than in healthy aorta rat model but remained moderated. A high limitation of the rabbit experiment is the small number of animal so the results need to be confirmed in a larger study. It has to be considered only a preview of the impact of Dex-PBMA and a proof of feasibility.

5 CONCLUSION

We evaluated a copolymer of dextran and PBMA to use it as a vascular stent coating. Dex-PBMA has suitable mechanical properties and resist to shear stress of flow. *In vitro* tests showed that bacterial adhesion on Dex-PBMA was very low. Besides, the copolymer limited platelet adhesion and moderated thrombin generation that is important to avoid acute and late stent thrombosis. *In vitro*, neither ECFCs nor MSCs adhered easily on the copolymer and their growths were slow. In parallel, we carried *ex vivo* experiments confirming the ability of Dex-PBMA to release a model molecule. To go further, *in vivo* studies were performed. Firstly, in a rat intramuscular implantation model no pathological foreign body reaction was observed. Then, *in situ*, in rat abdominal aorta model of stenting Dex-PBMA stent triggered a low neo-intima formation similar to those of bare metal stent and a reendotheliasation was noticed after 30 days. Finally we used a rabbit model of intimal hyperplasia to catch sight of the impact of Dex-PBMA and Dex-PBMA_{TAC} stents. Results were promising, neointima existed but arteries were still permeable and active molecules included in Dex-PBMA seemed to be able to be eluted and efficient.

Further evaluation need to be carry on, nevertheless Dex-PBMA display interesting properties for stent coating. Beyond its own biological properties, Dex-PBMA and drug association provide new ideas not only for stent but also for other vascular implants.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(Word Style "FA_Corresponding_Author_Footnote"). * (Word Style "FA_Corresponding_Author_Footnote"). Give contact information for the author(s) to whom correspondence should be addressed.

Present Addresses

†If an author's address is different than the one given in the affiliation line, this information may be included here.

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript. ‡These authors contributed equally. (match statement to author names with a symbol)

Funding Sources

This work was supported by the European program PRESTIGE. The Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, the Fédération Française de Cardiologie and the Société Française de Cardiologie pays the salary of C.Delattre. CNRS pays the salary of C. Boisson-Vidal.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the nursing services of Hôpital St Louis for providing umbilical cord blood samples.

REFERENCES

1. Haidopoulos, M.; Turgeon, S.; Sarra-Bournet, C.; Laroche, G.; Mantovani, D., Development of an optimized electrochemical process for subsequent coating of 316 stainless steel for stent applications. *Journal of materials science. Materials in medicine* **2006**, *17* (7), 647-57.
2. Katz, G.; Harchandani, B.; Shah, B., Drug-eluting stents: the past, present, and future. *Current atherosclerosis reports* **2015**, *17* (3), 485.
3. Puranik, A. S.; Dawson, E. R.; Peppas, N. A., Recent advances in drug eluting stents. *International journal of pharmaceutics* **2013**, *441* (1-2), 665-79.
4. Curcio, A.; Torella, D.; Indolfi, C., Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* **2011**, *75* (6), 1287-96.
5. Weisz, G.; Leon, M. B.; Holmes, D. R., Jr.; Kereiakes, D. J.; Popma, J. J.; Teirstein, P. S.; Cohen, S. A.; Wang, H.; Cutlip, D. E.; Moses, J. W., Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial. *Journal of the American College of Cardiology* **2009**, *53* (17), 1488-97.
6. Rodriguez, A. E., Coronary artery bypass surgery or coronary stenting in diabetic patients: too soon to make a

- statement? *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* **2014**, *15* (8), 421-3.
7. Iakovou, I.; Schmidt, T.; Bonizzi, E.; Ge, L.; Sangiorgi, G. M.; Stankovic, G.; Airoldi, F.; Chieffo, A.; Montorfano, M.; Carlino, M.; Michev, I.; Corvaja, N.; Briguori, C.; Gerckens, U.; Grube, E.; Colombo, A., 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.
 8. Ong, A. T.; McFadden, E. P.; Regar, E.; de Jaegere, P. P.; van Domburg, R. T.; Serruys, P. W., Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology* **2005**, *45* (12), 2088-92.
 9. Park, D. W.; Park, S. W.; Park, K. H.; Lee, B. K.; Kim, Y. H.; Lee, C. W.; Hong, M. K.; Kim, J. J.; Park, S. J., Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *The American journal of cardiology* **2006**, *98* (3), 352-6.
 10. Foin, N.; Lee, R. D.; Torii, R.; Guitierrez-Chico, J. L.; Mattesini, A.; Nijjer, S.; Sen, S.; Petraco, R.; Davies, J. E.; Di Mario, C.; Joner, M.; Virmani, R.; Wong, P., Impact of stent strut design in metallic stents and biodegradable scaffolds. *International journal of cardiology* **2014**, *177* (3), 800-8.
 11. McFadden, E. P.; Stabile, E.; Regar, E.; Cheneau, E.; Ong, A. T.; Kinnaird, T.; Suddath, W. O.; Weissman, N. J.; Torguson, R.; Kent, K. M.; Pichard, A. D.; Satler, L. F.; Waksman, R.; Serruys, P. W., Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* **2004**, *364* (9444), 1519-21.
 12. Serruys, P. W.; Daemen, J., Are drug-eluting stents associated with a higher rate of late thrombosis than bare metal stents? Late stent thrombosis: a nuisance in both bare metal and drug-eluting stents. *Circulation* **2007**, *115* (11), 1433-9; discussion 1439.
 13. Joner, M.; Nakazawa, G.; Finn, A. V.; Quee, S. C.; Coleman, L.; Acampado, E.; Wilson, P. S.; Skorija, K.; Cheng, Q.; Xu, X.; Gold, H. K.; Kolodgie, F. D.; Virmani, R., Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology* **2008**, *52* (5), 333-42.
 14. Virmani, R.; Guagliumi, G.; Farb, A.; Musumeci, G.; Grieco, N.; Motta, T.; Mihalcik, L.; Tespili, M.; Valsecchi, O.; Kolodgie, F. D., Localized hypersensitivity and late coronary thrombosis secondary to a sirolimus-eluting stent: should we be cautious? *Circulation* **2004**, *109* (6), 701-5.
 15. Bartorelli, A. L.; Trabattoni, D.; Fabbocchi, F.; Montorsi, P.; de Martini, S.; Calligaris, G.; Teruzzi, G.; Galli, S.; Ravagnani, P., Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent. *Journal of interventional cardiology* **2003**, *16* (6), 499-505.
 16. Khan, W.; Farah, S.; Domb, A. J., Drug eluting stents: developments and current status. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2012**, *161* (2), 703-12.
 17. Abizaid, A.; Costa, J. R., Jr., New drug-eluting stents: an overview on biodegradable and polymer-free next-generation stent systems. *Circulation. Cardiovascular interventions* **2010**, *3* (4), 384-93.
 18. Sun, D.; Zheng, Y.; Yin, T.; Tang, C.; Yu, Q.; Wang, G., Coronary drug-eluting stents: From design optimization to newer strategies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2014**, *102* (5), 1625-1640.
 19. Svedman, C.; Moller, H.; Gruvberger, B.; Gustavsson, C. G.; Dahlin, J.; Persson, L.; Bruze, M., Implants and contact allergy: are sensitizing metals released as haptens from coronary stents? *Contact dermatitis* **2014**, *71* (2), 92-7.
 20. Kipshidze, N.; Dangas, G.; Tsapenko, M.; Moses, J.; Leon, M. B.; Kutryk, M.; Serruys, P., Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *Journal of the American College of Cardiology* **2004**, *44* (4), 733-9.
 21. Hu, T.; Yang, J.; Cui, K.; Rao, Q.; Yin, T.; Tan, L.; Zhang, Y.; Li, Z.; Wang, G., Controlled Slow-Release Drug-Eluting Stents for the Prevention of Coronary Restenosis: Recent Progress and Future Prospects. *ACS applied materials & interfaces* **2015**, *7* (22), 11695-712.
 22. Garg, S.; Serruys, P. W., Coronary stents: current status. *Journal of the American College of Cardiology* **2010**, *56* (10 Suppl), S1-42.
 23. Derkaoui, S. M.; Labbe, A.; Chevallier, P.; Holvoet, S.; Roques, C.; Avramoglou, T.; Mantovani, D.; Letourneur, D., A new dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on 316L metallic stents enhances endothelial cell coverage. *Acta biomaterialia* **2012**, *8* (9), 3509-15.
 24. Derkaoui, S. M.; Labbe, A.; Purnama, A.; Gueguen, V.; Barbaud, C.; Avramoglou, T.; Letourneur, D., Films of dextran-graft-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. *Acta biomaterialia* **2010**, *6* (9), 3506-13.
 25. De Groot, C. J.; Van Luyn, M. J.; Van Dijk-Wolthuis, W. N.; Cadee, J. A.; Plantinga, J. A.; Den Otter, W.; Hennink, W. E., In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* **2001**, *22* (11), 1197-203.
 26. Ino, J. M.; Sju, E.; Ollivier, V.; Yim, E. K.; 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**, *101* (8), 1549-59.
 27. Zemani, F.; Silvestre, J. S.; Fauvel-Lafeve, F.; Bruel, A.; Vilar, J.; Bieche, I.; Laurendeau, I.; Galy-Fauroux, I.; Fischer, A. M.; Boisson-Vidal, C., Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2008**, *28* (4), 644-50.
 28. Vanneaux, V.; Farge-Bancel, D.; Lecourt, S.; Baraut, J.; Cras, A.; Jean-Louis, F.; Brun, C.; Verrecchia, F.; Larghero, J.; Michel, L., Expression of transforming growth factor beta receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ open* **2013**, *3* (1).
 29. Anagnostou, F.; Debet, A.; Pavon-Djavid, G.; Goudaby, Z.; Helary, G.; Migonney, V., Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting *Staphylococcus aureus* adhesion inhibition. *Biomaterials* **2006**, *27* (21), 3912-9.
 30. Bosman, W. M.; Borger van der Burg, B. L.; Schuttevaer, H. M.; Thoma, S.; Hedeman Joosten, P. P., Infections of intravascular bare metal stents: a case report and review of literature. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* **2014**, *47* (1), 87-99.
 31. Belabani, C.; Rajasekharan, S.; Poupon, V.; Johnson, T.; Bar-Or, A.; Autoimmunity, C. M. N. i. C.; Canadian Pediatric Demyelinating Disease, N., A condensed performance-validation strategy for multiplex detection kits used in studies of human clinical samples. *Journal of immunological methods* **2013**, *387* (1-2), 1-10.
 32. Rippstein, P.; Black, M. K.; Boivin, M.; Veinot, J. P.; Ma, X.; Chen, Y. X.; Human, P.; Zilla, P.; O'Brien, E. R., Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **2006**, *54* (6), 673-81.
 33. Feldman, L. J.; Aguirre, L.; Ziol, M.; Bridou, J. P.; Nevo, N.; Michel, J. B.; Steg, P. G., Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* **2000**, *101* (8), 908-16.
 34. An, Y. H.; Friedman, R. J., Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research* **1998**, *43* (3), 338-48.

35. Zucker, M. B.; Nachmias, V. T., Platelet activation. *Arteriosclerosis* **1985**, *5* (1), 2-18.
36. Basalus, M. W.; Tandjung, K.; van Westen, T.; Sen, H.; van der Jagt, P. K.; Grijpma, D. W.; van Apeldoorn, A. A.; von Birgelen, C., Scanning electron microscopic assessment of coating irregularities and their precursors in unexpanded durable polymer-based drug-eluting stents. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* **2012**, *79* (4), 644-53.
37. Wiemer, M.; Butz, T.; Schmidt, W.; Schmitz, K. P.; Horstkotte, D.; Langer, C., Scanning electron microscopic analysis of different drug eluting stents after failed implantation: from nearly undamaged to major damaged polymers. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* **2010**, *75* (6), 905-11.
38. Denardo, S. J.; Carpinone, P. L.; Vock, D. M.; Tchong, J. E.; Phillips, H. R., 3rd; Willenberg, B. J.; Batich, C. D.; Pepine, C. J., Detailed analysis of polymer response to delivery balloon expansion of drug-eluting stents versus bare metal stents. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* **2013**, *9* (3), 389-97.
39. Ma, J.; Zhao, N.; Zhu, D., Sirolimus-eluting dextran and polyglutamic acid hybrid coatings on AZ31 for stent applications. *Journal of biomaterials applications* **2015**.
40. Luo, R.; Tang, L.; Zhong, S.; Yang, Z.; Wang, J.; Weng, Y.; Tu, Q.; Jiang, C.; Huang, N., 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.
41. Mao, L.; Shen, L.; Chen, J.; Wu, Y.; Kwak, M.; Lu, Y.; Xue, Q.; Pei, J.; Zhang, L.; Yuan, G.; Fan, R.; Ge, J.; Ding, W., Enhanced Bioactivity of Mg-Nd-Zn-Zr Alloy Achieved with Nanoscale MgF₂ Surface for Vascular Stent Application. *ACS applied materials & interfaces* **2015**, *7* (9), 5320-30.
42. Zilla, P.; Bezuidenhout, D.; Human, P., Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* **2007**, *28* (34), 5009-27.
43. Inoue, T.; Croce, K.; Morooka, T.; Sakuma, M.; Node, K.; Simon, D. I., Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC. Cardiovascular interventions* **2011**, *4* (10), 1057-66.
44. Lavergne, M.; Derkaoui, M.; Delmau, C.; Letourneur, D.; Uzan, G.; Le Visage, C., Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromolecular bioscience* **2012**, *12* (7), 901-10.
45. Obi, S.; Masuda, H.; Akimaru, H.; Shizuno, T.; Yamamoto, K.; Ando, J.; Asahara, T., Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiological reports* **2014**, *2* (3), e00261.
46. Kim, S. H.; Ha, H. J.; Ko, Y. K.; Yoon, S. J.; Rhee, J. M.; Kim, M. S.; Lee, H. B.; Khang, G., Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **2007**, *18* (5), 609-22.
47. Milleret, V.; Ziogas, A.; Buzzi, S.; Heuberger, R.; Zucker, A.; Ehrbar, M., Effect of oxide layer modification of CoCr stent alloys on blood activation and endothelial behavior. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* **2015**, *103* (3), 629-40.
48. Vaudaux, P.; Avramoglou, T.; Letourneur, D.; Lew, D. P.; Jozefonvicz, J., Inhibition by heparin and derivatized dextrans of Staphylococcus aureus adhesion to fibronectin-coated biomaterials. *Journal of biomaterials science. Polymer edition* **1992**, *4* (2), 89-97.
49. Rao, H.; Zhang, Z.; Liu, F., Enhanced mechanical properties and blood compatibility of PDMS/liquid crystal cross-linked membrane materials. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **2013**, *20*, 347-53.
50. Naseerali, C. P.; Hari, P. R.; Sreenivasan, K., The release kinetics of drug eluting stents containing sirolimus as coated drug: role of release media. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2010**, *878* (7-8), 709-12.
51. Papafaklis, M. I.; Chatzizisis, Y. S.; Naka, K. K.; Giannoglou, G. D.; Michalis, L. K., Drug-eluting stent restenosis: effect of drug type, release kinetics, hemodynamics and coating strategy. *Pharmacology & therapeutics* **2012**, *134* (1), 43-53.
52. Shaulov, Y.; Okner, R.; Levi, Y.; Tal, N.; Gutkin, V.; Mandler, D.; Domb, A. J., Poly(methyl methacrylate) grafting onto stainless steel surfaces: application to drug-eluting stents. *ACS applied materials & interfaces* **2009**, *1* (11), 2519-28.
53. Anderson, J. M.; Rodriguez, A.; Chang, D. T., Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* **2008**, *20* (2), 86-100.
54. Park, S.; Park, M.; Kim, B. H.; Lee, J. E.; Park, H. J.; Lee, S. H.; Park, C. G.; Kim, M. H.; Kim, R.; Kim, E. H.; Heo, C. Y.; Choy, Y. B., Acute suppression of TGF- β 1 with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* **2015**, *200*, 125-37.
55. Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B., An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1975**, *72* (9), 3666-70.

2. Présentations orale et poster

2.1. Printemps de la cardiologie 2013

Marseille, les 18 et 19 avril 2013.

Présentation d'un poster et présentation orale

Abstract: Design of a new polymer for stent coating: *in vitro* and *in vivo* studies.

Cécilia Delattre, Caroline Roques, Véronique Ollivier, Graciela Pavon-Djavid, Liliane Louedec, Martine Jandrot-Perrus, Didier Letourneur and Anne Meddahi-Pellé.

Restenosis and late thrombosis are still a serious concern following stent implantation. Our work aims at developing a new material for stent coating. Preliminary studies highlighted that dextran grafted with poly(butylmethacrylate) (PBMA) displayed suitable elastic properties and allowed stent coating. Dex-PBMA copolymer was also reported to promote endothelial cells proliferation while limiting smooth muscle cells growth. The purpose of our study was: 1) the evaluation of interactions between films of Dex-PBMA and blood components; 2) the assessment of foreign body reaction against this material.

Static platelet adhesion on Dex-PBMA copolymer was measured using human platelets in suspension. The shape of platelets adhering to the copolymer was investigated by scanning electron microscopy (SEM). Platelet adhesion was also carried out in flow condition using whole anticoagulated blood and Dex-PBMA or collagen-coated flow chambers. Thrombin generation in platelet rich or poor plasma (PRP and PPP) was measured on Dex-PBMA. *In vivo* tolerance was evaluated in male Wistar rats by intramuscular implantation of copolymer films and observation after 7, 15 and 30 days.

Platelet adhesion in static conditions was decreased 3 fold on Dex-PBMA films as compared to collagen and at arterial shear rate, did not adhere at all. In addition, SEM micrographs highlighted a low level of spreading on the Dex-PBMA. In PRP, Dex-PBMA did not trigger more thrombin generation than tissue factor (TF) 0.5 pM. Besides in PPP, the copolymer decreased 4 times the peak of thrombin as compared to the one induced by 1 pM TF. No inflammatory reaction was observed at the site of implantation and after staining, a layer of fibroblastic cells surrounded the copolymer.

These results indicate that a surface of Dex-PBMA limits platelet adhesion and activation, has a limited procoagulant activity and is not proinflammatory. The next step will consist in implanting Dex-PBMA-coated stents in a rat abdominal aorta.

DESIGN OF A NEW POLYMER FOR STENT COATING: IN VITRO AND IN VIVO STUDIES



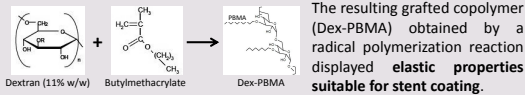
C. DELATTRE^{1,2}, C. ROQUES¹, V. OLLIVIER¹, G. PAVON-DJAVID², L. LOUEDEC¹,
M. JANDROT-PERRUS¹, D. LETOURNEUR^{1,2} and A. MEDDAHI-PELLE^{1,2}

¹INSERM, U698, Hemostasis, Bio-engineering and Cardiovascular Remodeling, CHU Bichat, Paris
²Université Paris 13, Sorbonne Paris-Cité, F93430, Villetaneuse

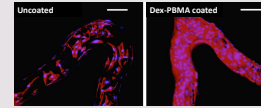


INTRODUCTION

Drug-eluting stents (DES) have decreased the formation of a neo-intima leading to **restenosis** compared to **bare metal stents**. However, patients receiving DES are at higher risk to develop **late stent thrombosis**. This adverse event seems to be resulting from a **lack of re-endothelialization** as well as sustained **platelet activation**. In this context, we previously developed a copolymer combining **dextran** and **polybutylmethacrylate (PBMA)**.



Furthermore, *in vitro*, Dex-PBMA **enhanced endothelial cells (ECs) proliferation** compare to bare metal stent while **limiting smooth muscle cells growth**.



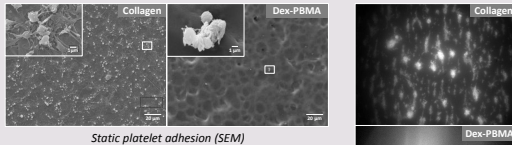
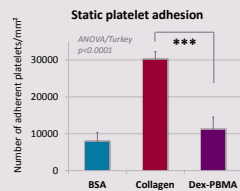
Fluorescence images of ECs, 5 days after being seeded directly onto stent. Scale bars, 200 μm. S.M Derkaoui et al., Acta Biomaterialia 8 (2012) 3509-3515

To go further, our study aimed at **evaluating this new polymeric material**. We investigated **interactions with blood cells**, in particular platelets, and the ***in vivo* tissue reaction**.

IN VITRO: INTERACTIONS BETWEEN DEXTRAN-PBMA AND BLOOD

PLATELET INTERACTION

Static platelet adhesion was measured using platelets in suspension. **Dex-PBMA copolymer** has demonstrated its capacity to **prevent platelet adhesion**, compared to collagen coated wells. In addition, SEM micrographs highlighted a **low level of spreading** on this material.



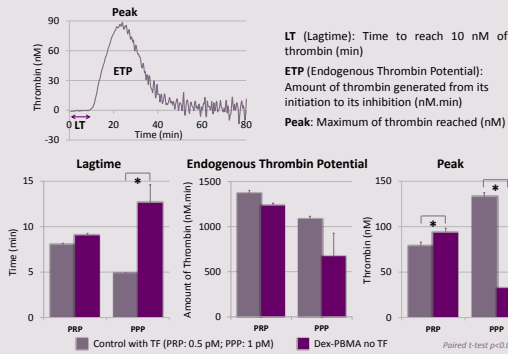
Static platelet adhesion (SEM)

A dynamic test using whole anticoagulated blood mimicking the arterial flow (shear rate of 1500 sec⁻¹) also demonstrated that glass coverslips coated with **Dex-PBMA** were able to **prevent platelet activation and adhesion**, while collagen coated coverslips were covered with thrombi after 5 min.

Dex-PBMA does not entail the adhesion of platelets and does not trigger more thrombin generation than tissue factor.

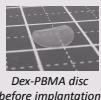
THROMBIN GENERATION

Thrombin generation in **platelet-rich or poor plasma (PRP or PPP)** was measured either on **uncoated wells (Immulon 2B) containing tissue factor (TF)** or on **Dex-PBMA without TF**.



In **PPP**, **Dex-PBMA trigger a small thrombin generation** whereas in **PRP it was similar to TF**. This means that the **slight activation of platelet is enough to triggered thrombin generation**.

IN VIVO: DEXTRAN-PBMA INTRA-MUSCULAR IMPLANTATION

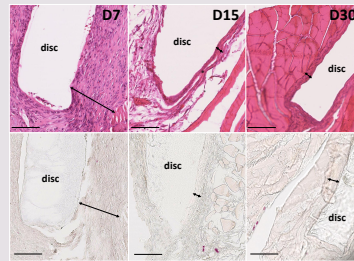


Dex-PBMA disc before implantation

In vivo tolerance was evaluated in 9-week-old male **Wistar rats** by **intramuscular implantation of Dex-PBMA discs** (diameter 8 mm, thickness 95 μm). Samples were harvested after **7, 15 and 30 days**.

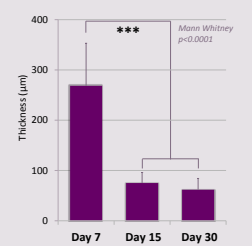
Hematoxylin-eosin staining highlighted a **cell cap**. A Napthtol AS-D Chloroacetate staining, specific to esterase, revealed that these cells were **neither macrophages nor polynuclear neutrophils**. Thus, this cell cap should be composed of **fibroblasts**.

Moreover, the **thickness of this layer** was quantified. As early as **15 days** after implantation it was **4 times thinner than after 7 days**.



Hematoxylin-eosin staining (up) and Napthtol AS-D Chloroacetate staining (down) after 7, 15 and 30 days. Scale bars, 100μm.

Evolution of the thickness of the cell cap



Dex-PBMA does not induce a pathological foreign body reaction. The fibrous cap surrounding the copolymer becomes thinner over time.

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

These results indicate that a **surface of Dex-PBMA limits platelet adhesion and activation**, displays a **limited procoagulant activity** and is **not proinflammatory**. The next step will consist in **implanting Dex-PBMA-coated stents** in a rat abdominal aorta. An additional benefit of this coating could be to **combine Dex-PBMA with a drug** and thus **potentiate this material as a drug delivery platform**.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors would like to thank the **European program PRESTIGE**, the **Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire**, the **Fédération Française de Cardiologie** and the **Société Française de Cardiologie** for providing financial support to this project.

2.2. Journée de l'école doctorale Galilée 2013

Villetaneuse, le 14 juin 2013

Présentation du même poster que pour le Printemps de la Cardiologie 2013 et présentation orale flash de 2 min

Résumé: Conception et validation de nouveaux stents pour applications cardiovasculaires

Les stents sont devenus le principal outil de revascularisation myocardique mais la survenue d'une resténose ou d'une thrombose tardive intra-stent reste des complications majeures. La nécessité de mettre au point de nouveaux revêtements est donc un objectif important, c'est l'objet de ce travail de thèse. Des études préliminaires ont démontré qu'un copolymère de dextrans et poly méthacrylate de butyle (Dex-PBMA) présentait des propriétés mécaniques permettant le revêtement de stent. Il permet la prolifération des cellules endothéliales, nécessaire à la réparation vasculaire, tout en limitant la croissance des cellules musculaires lisses, sources de resténose. L'objectif de notre étude est d'évaluer : 1) les interactions entre les films de Dex-PBMA et le compartiment sanguin; 2) in vivo, la réaction à corps étranger de ce matériau.

Les interactions entre le Dex-PBMA et les plaquettes ont été évaluées en conditions statiques, puis en conditions dynamiques. L'adhésion sur le Dex-PBMA des plaquettes humaines en condition statique a été mesurée. La forme des plaquettes adhérentes a été observée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB). En conditions dynamiques, l'adhésion plaquettaire a été évaluée en sang total anti-coagulé dans des chambres revêtues de Dex-PBMA ou de collagène (contrôle). La thrombine générée au contact du Dex-PBMA a été mesurée en plasma humain riche ou pauvre en plaquettes (PRP ou PPP). La tolérance du matériau in vivo a été évaluée par implantation de film de copolymère en intramusculaire, chez le rat et explanté à 7, 15 et 30 jours.

En conditions statiques, 3 fois moins de plaquettes ont adhéré sur la surface Dex-PBMA comparé au contrôle collagène. Sous un flux artériel, aucune adhésion plaquettaire n'est observée, résultat confirmé par les images MEB qui montrent un faible étalement des plaquettes sur le Dex-PBMA. En PRP, le Dex-PBMA n'entraîne pas une génération de thrombine supérieure à celle produite par 0,5 pM de facteur tissulaire (FT). De plus, en PPP le pic de thrombine est 4 fois plus important que celui induit par 1 pM de FT. In vivo, aucune réaction inflammatoire n'a été observée tant en macroscopie qu'après immuno marquage.

Ces résultats indiquent que le Dex-PBMA limite l'adhésion ainsi que l'activation plaquettaire, qu'il a un effet pro-coagulant modéré et qu'il n'est pas pro-inflammatoire. La prochaine étape est l'implantation in situ de stents revêtus de Dex-PBMA dans l'aorte abdominale de rat.

2.3. European Conference of Biomaterials 2013

Madrid, du 8 au 12 septembre 2013.

Présentation d'un poster

Abstract: Design of a new polymer for stent coating: in vitro and in vivo studies.

Cécilia Delattre¹, Caroline Roques¹, Véronique Ollivier¹, Graciela Pavon-Djavid¹, Liliane Louedec¹, Martine Jandrot-Perrus¹, Didier Letourneur¹ and Anne Meddahi-Pellé¹.

¹INSERM/U698, CHU X. Bichat, Université Paris Cité, France

INTRODUCTION

Restenosis and late thrombosis are still a serious concern following stent implantation. Our work aims at developing a new material for stent coating. Preliminary studies highlighted that dextran grafted with poly(butylmethacrylate) (PBMA) displayed suitable elastic properties and allowed stent coating. Dex-PBMA copolymer was also reported to promote endothelial cell proliferation while limiting smooth muscle cells growth¹. The purpose of our study was: 1) the evaluation of interactions between films of Dex-PBMA and platelets; 2) the assessment of foreign body reaction against this material.

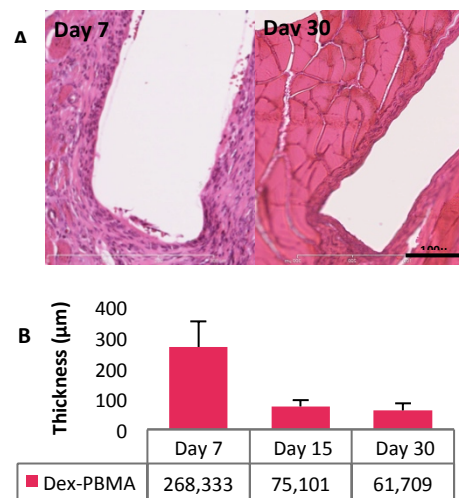
EXPERIMENTAL METHODS

Static platelet adhesion on Dex-PBMA copolymer was measured using human platelets in suspension. The shape of platelets adhering to the copolymer was investigated by scanning electron microscopy (SEM). Platelet adhesion was also carried out in flow condition using whole anticoagulated blood and Dex-PBMA or collagen-coated flow chambers. *In vivo* tolerance was evaluated in male Wistar rats after intramuscular implantation of copolymer films. Samples were harvested after 7, 15 and 30 days and submitted to histological evaluation. The thickness of the layer of cells surrounding the film was assessed.

RESULTS AND DISCUSSION

Platelet adhesion in static conditions was decreased 3-fold on Dex-PBMA films as compared to collagen. Under arterial-like shear rate, platelets did not adhere on copolymer coating. In addition, SEM micrographs highlighted a low level of spreading of the platelets on the Dex-PBMA. Regarding foreign body reaction, no inflammatory reaction was observed at the site of implantation and a layer of fibroblastic cells surrounded the copolymer.

The thickness of the cell layer decreased over time. Thus the use of Dex-PBMA as a drug delivery platform could be considered.



"Figure 1 shows *in vivo* reaction to intramuscular implantation of Dex-PBMA in male Wistar rat; A/hematoxylin eosin stainings after 7 and 30 days; B/Analysis of the thickness of the fibrotic capsule"

CONCLUSION

These results indicate that a surface of Dex-PBMA limits platelet adhesion and activation. No adverse reaction was observed after *in vivo* implantation. The next step will consist in implanting Dex-PBMA-coated stents *in situ*, in a rat abdominal aorta.

REFERENCES

1. Derkaoui M. *et al.*, Acta Biomater. (2010), 6:3506-3513

ACKNOWLEDGMENTS

"The authors would like to thank the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, the Fédération Française de Cardiologie and the Société Française de Cardiologie and the European program PRESTIGE for providing financial support to this project".

DESIGN OF A NEW POLYMER FOR STENT COATING IN VITRO & IN VIVO STUDIES



C. DELATTRE^{1,2}, C. ROQUES¹, V. OLLIVIER¹, SM. DERKAOUI¹, L. LOUEDEC¹, M. JANDROT-PERRUS¹,
D. LETOURNEUR^{1,2} and A. MEDDAHI-PELLE^{1,2}

¹INSERM, U698, Hemostasis, Bio-engineering and Cardiovascular Remodeling, F-75018 Paris
²Université Paris 13, Sorbonne Paris-Cité

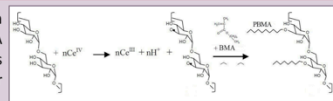


1-INTRODUCTION

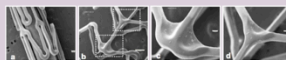
Drug-eluting stents (DES) have decreased the formation of a neo-intima leading to **restenosis** compared to **bare metal stents**. However, patients receiving DES are at higher risk to **develop late stent thrombosis**. This adverse event seems to be resulting from a **lack of re-endothelialization** as well as sustained **platelet activation**. In this context, we developed a copolymer of **dextran** and **polybutylmethacrylate (PBMA)** to combine **biological properties** of this polysaccharide and **mechanical properties** of the synthetic polymer.

2-POLYMER FORMULATION

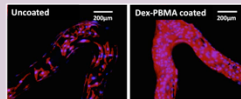
A **specific radical polymerization reaction** of dextran and PBMA (introduced at 1:16 w/w) leads to the grafted copolymer **Dex-PBMA**.



The obtained powder can be shaped as a **uniform and smooth film** displaying **elastic properties** suitable for stent coating.



Dex-PBMA coated stent before (a) and after dilatation by an angioplasty balloon (b-d) (SEM)

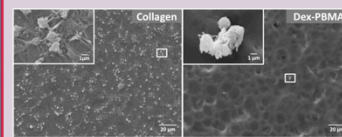


Fluorescence images of ECs, 5 days after being seeded directly onto stent
S.M Derkaoui et al., Acta Biomaterialia 8 (2012) 3509-3515

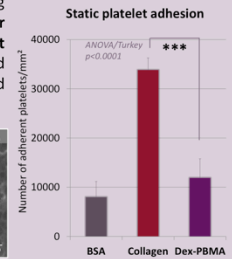
Furthermore *in vitro* Dex-PBMA **enhances endothelial cell (EC) proliferation** compared to bare metal stent while **limiting smooth muscle cell (SMC) growth**.

3-INTERACTIONS WITH PLATELETS

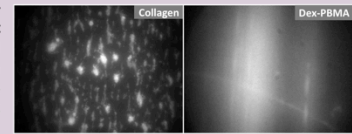
Static platelet adhesion was measured using platelets in suspension. **Dex-PBMA copolymer** has demonstrated its capacity to **prevent platelet adhesion** compared to collagen coated wells. In addition, SEM micrographs highlighted a **low level of spreading** on this material.



Static platelet adhesion (SEM)



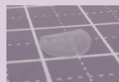
A dynamic test using whole anticoagulated blood and Dioc-6-labeled platelets mimicking the arterial flow (shear rate of 1500 s⁻¹) also demonstrated that glass coverslips coated with **Dex-PBMA** were able to **prevent platelet activation and adhesion**, while collagen coated coverslips were covered with thrombi after 5 min.



Fluorescence images of dynamic platelets adhesion

Dex-PBMA does not entail the adhesion of platelets

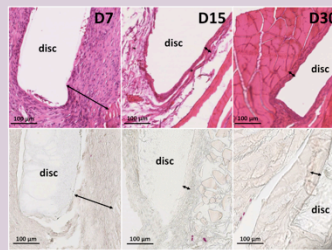
4-DEX-PBMA INTRA-MUSCULAR IMPLANTATION



Dex-PBMA disc before implantation

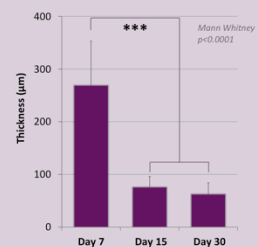
In vivo tolerance was evaluated in 9-week-old male **Wistar rats** by **intramuscular implantation** of Dex-PBMA discs (diameter 8 mm, thickness 95 μm). Samples were harvested after **7, 15 and 30 days**.

Hematoxylin-eosin (HE) staining highlighted a **cell cap** (delimited by arrow). A Naphthol AS-D Chloroacetate staining, specific to esterase, revealed that these cells were **neither macrophages nor polynuclear neutrophils**. Thus, this cell cap should be composed of **fibroblasts**. Moreover, the **thickness of this layer** measured on HE staining decrease with time (**4 times thinner at day 15 than after 7 days**).



Hematoxylin-eosin staining (top) and Naphthol AS-D Chloroacetate staining (bottom) after 7, 15 and 30 days.

Evolution of the cell cap thickness



Dex-PBMA does not induce a pathological foreign body reaction
The fibrous cap surrounding the copolymer becomes thinner over time

5-CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

Dex-PBMA films have **appropriate mechanical properties** to coat a stent and **enable both the proliferation of ECs and the decrease SMCs growth**. Besides, a **surface of Dex-PBMA limits platelet adhesion and activation** and **doesn't trigger foreign body reaction**. The next step will consist in implanting Dex-PBMA-coated stents in a rat abdominal aorta. An additional benefit of this polymer could be to combine Dex-PBMA with a drug and thus potentiate this material as a drug delivery platform.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors would like to thank the European program PRESTIGE, the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, the Fédération Française de Cardiologie and the Société Française de Cardiologie for providing financial support to this project.



2.4. Printemps de la cardiologie 2014

Strasbourg, les 24 et 25 avril 2014.

Présentation poster.

Abstract: Evaluation of a new polymer for stent coating: *in vitro* and *in vivo* studies.

Cécilia Delattre, Caroline Roques, Graciela Pavon-Djavid, Liliane Louedec, Catherine Boisson-Vidal, Didier Letourneur and Anne Meddahi-Pellé.

Restenosis and late thrombosis are still a serious concern following stent implantation. Our work aims at developing a new copolymer of dextran and poly(butylmethacrylate) (Dex-PBMA) for stent coating to improve the biocompatibility of metallic stents. Preliminary studies highlighted that this material has suitable mechanical properties for stent coating and triggers no *in vitro* human platelet adhesion. To go further we evaluated human adult stem cells adhesion on their surface *in vitro* in static conditions and checked *in vivo* tissue reaction when implanted in the vascular system of healthy rats.

Human endothelial colony-forming cells (ECFC), isolated from umbilical cord blood on the basis of CD34 expression and human mesenchymal stem cells (MSC), from human bone marrow were seeded on CoCr discs coated or not with copolymer. Cell adhesion was evaluated after 20 min (intermediate adhesion) and 2 hours (focal adhesion) incubation. The modification to the surface chemistry of CoCr did affect stem cell behaviour in terms of cells adhesion. *In vitro*, ECFCs adhered 5 times less on Dex-PBMA compared to CoCr alone, and no statistical difference has been noticed on MSCs.

In vivo, Dex-PBMA coated stents were implanted into the abdominal aorta of healthy male Wistar rats (n=3). All rats have survived after 30 days and the angiograms confirmed that the stented arteries were permeable. No inflammation has been emphasized by CD 68 immunostaining and measures on orceine staining didn't highlight a significant difference of the ratio intima/media between coated and bare metal stent.

These results indicated that a surface of Dex-PBMA did not promote any specific adhesion of ECFC or MSC. *In vivo*, Dex-PBMA coated stents are well tolerated. The next step will consist in implanting Dex-PBMA-coated stents in a rat abdominal aorta after ballooning.



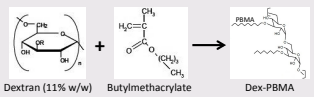
Design of a new polymer for stent coating: *in vitro* and *in vivo* studies

C. DELATTRE^{1,2}, C. ROQUES, G. PAVON-DJAVID^{1,2}, L. LOUEDEC¹,
C. BOISSON-VIDAL³, D. LETOURNEUR^{1,2} and A. MEDDAHI-PELLE^{1,2}
¹INSERM, U1148 Hemostasis, Bio-engineering and Cardiovascular Remodeling, CHU Bichat, Paris
²Université Paris 13, Sorbonne Paris-Cité, F93430 Villetaneuse
³INSERM, UMR_S1140, Université Paris Cité, Sorbonne Paris-Cité, F75006 Paris



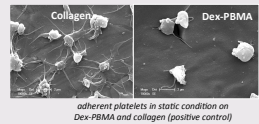
INTRODUCTION

Drug-eluting stents (DES) have decreased the formation of a neo-intima leading to **restenosis** compared to **bare metal stents**. However, patients receiving DES are at higher risk of developing **late stent thrombosis**. This adverse effect seems to be the result of a **lack of re-endothelialization** and of sustained **platelet activation**. In this context, we previously developed a copolymer combining **dextran** and **polybutylmethacrylate (PBMA)**.



The resulting grafted copolymer (Dex-PBMA) obtained by a radical polymerization reaction displayed **elastic properties** suitable for stent coating.

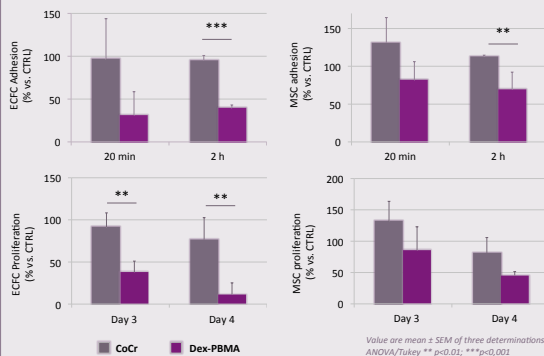
Furthermore, *in vitro*, Dex-PBMA **limits platelet adhesion and activation**, displays a **limited procoagulant activity**. *In vivo*, Dex-PBMA does not induce a high level of foreign body reaction after intramuscular implantation in rat model.



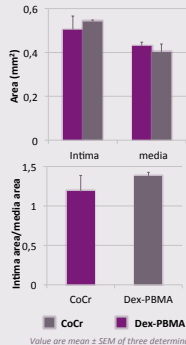
To go further, we investigated the interactions of Dex-PBMA with circulating cells and *in vivo* aortic reaction to coated stent implantation in rat model.

IN VITRO: INTERACTIONS BETWEEN DEXTRAN-PBMA AND CELLS

Intermediate (20min) and focal (2h) adhesion or proliferation (72h and 96h) of human endothelial colony-forming cells (ECFC) and human mesenchymal stem cells (MSC) were evaluated on **Dex-PBMA-coated discs compared to bare-CoCr discs**. Results are expressed as a percentage of the gelatin-positive control (CTRL).



Dex-PBMA does not enhance either ECFCs or MSC adhesion and proliferation



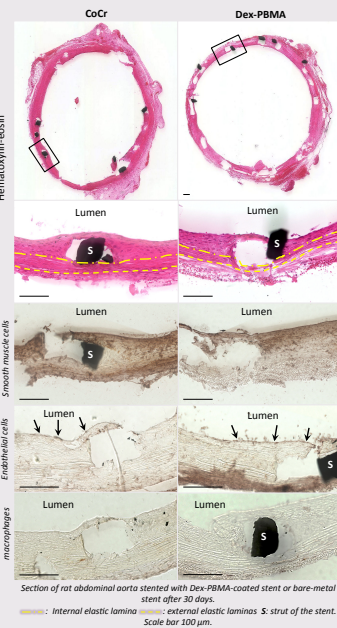
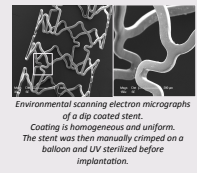
The arterial tissue reaction assessment was undertaken. The intima area (difference between the internal elastic lamina and the lumen areas) and the media area (area between the external and internal elastic lamina) were determined. The ratios of intima/media areas were also compared. **No significant differences were observed between the Dex-PBMA-coated stents and the bare-metal stents.**

After 30 days, the stented aorta were permeable. In Dex-PBMA-coated stents or in bare-metal stents, a **limited intimal hyperplasia** was observed. This intimal hyperplasia was composed mainly of **SMCs**. **No macrophages were evidenced.** Furthermore, an **endothelium layer** was observed.

An endothelium layer was observed with the Dex-PBMA-coated stent. Furthermore, the neo-intimal hyperplasia was limited.

IN VIVO: DEXTRAN-PBMA COATED STENT IMPLANTATION

After dissection and a small transversal arteriotomy, Dex-PBMA-coated stent or bare-metal stent (8 mm long – Ø2.25 mm) expand in the last portion of the infra-renal abdominal aorta of 11-weeks-old male Wistar rats (n=3). After 30 days, an angiography was performed before animal euthanasia and stented aortas were harvested, methyl methacrylate-embedded and histologically analyzed.



CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Our findings demonstrate that **Dex-PBMA-coated stent is covered by an endothelial layer *in vivo***. The next step will consist in validating the Dex-PBMA-coated stents in a stent restenosis rabbit animal model. One beneficial alternative would be to combine Dex-PBMA with a drug to develop a drug delivery platform. To go further, we developed an *ex vivo* system to assess drug release kinetic.

ACKNOWLEDGMENTS: The authors would like to thank the European program PRESTIGE, the Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardio-vasculaire, the Fédération Française de Cardiologie and the Société Française de Cardiologie for providing financial support to this project.

3. Article de presse

Article de présentation des projets financés par la Fédération Française de Cardiologie

Circulation December 3/10, 2013

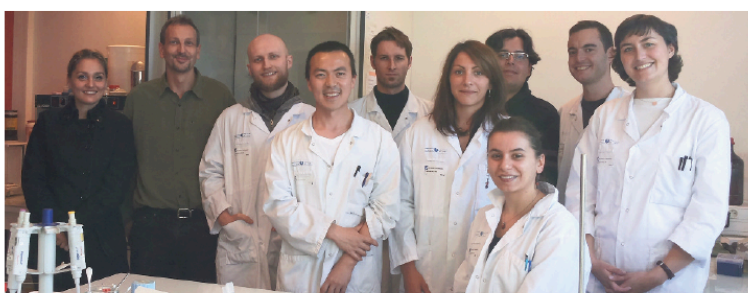
Circulation

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

European Perspectives in Cardiology



Designing and Validating New Stents



Cécilia Delattre with colleagues. Photo courtesy of Cécilia Delattre.

Cécilia Delattre, PhD student, INSERM U698, Bio-engineering for Cardiovascular Imaging and Therapy, Paris, France, received funding to design and validate new stents for cardiovascular use. The European programme “Prevention of Late Stent Thrombosis by an Interdisciplinary Global European Effort” gathers together 14 labs and companies. Ms Delattre says, “In this context, our purpose is to design a new stent coating to limit both restenosis and late thrombosis. Our lab is focused on polysaccharides and particularly their uses for therapeutic and imaging cardiovascular applications.” The group has prepared a copolymer of dextran and polybutylmethacrylate and is evaluating its interactions with blood, in particular its impact on thrombus formation. Ms Delattre is conducting the work with Caroline Roques, PharmD, PhD, and Didier Letourneur, PhD, from INSERM U698, and Professor Anne Meddahi-Pelle, MD, PhD, from Université Paris 13.

Jennifer Taylor is a freelance medical journalist.

RÉFÉRENCES

1. Thompson RC, Allam AH, Lombardi GP, et al. Atherosclerosis across 4000 years of human history: the Horus study of four ancient populations. *Lancet* 2013;381:1211-22.
2. Derkaoui SM, Labbe A, Purnama A, et al. Films of dextran-graft-polybutylmethacrylate to enhance endothelialization of materials. *Acta biomaterialia* 2010;6:3506-13.
3. Gutierrez E, Flammer AJ, Lerman LO, Elizaga J, Lerman A, Fernandez-Aviles F. Endothelial dysfunction over the course of coronary artery disease. *European heart journal* 2013;34:3175-81.
4. Seguin T, Braun T, Mira JP. [Endothelial progenitor cells: new biomarkers and potential therapy in intensive care]. *Medecine et maladies infectieuses* 2007;37:305-11.
5. Landau C, Lange RA, Hillis LD. Percutaneous transluminal coronary angioplasty. *The New England journal of medicine* 1994;330:981-93.
6. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *The New England journal of medicine* 1994;331:489-95.
7. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: current status. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:S1-42.
8. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *The New England journal of medicine* 2007;356:1503-16.
9. Curcio A, Torella D, Indolfi C. Mechanisms of smooth muscle cell proliferation and endothelial regeneration after vascular injury and stenting: approach to therapy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2011;75:1287-96.
10. Bauters C, Meurice T, Hamon M, McFadden E, Lablanche JM, Bertrand ME. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice. *Cardiovascular research* 1996;31:835-46.
11. Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 1998;98:224-33.
12. 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;356:1020-9.
13. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni 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;293:2126-30.
14. Bosman WM, Borger van der Burg BL, Schuttevaer HM, Thoma S, Hedeman Joosten PP. Infections of intravascular bare metal stents: a case report and review of literature. *European journal of vascular and endovascular surgery : the official journal of the European Society for Vascular Surgery* 2014;47:87-99.
15. Roguin A. Stent: the man and word behind the coronary metal prosthesis. *Circulation Cardiovascular interventions* 2011;4:206-9.
16. Weldon CS, Ameli MM, Morovati SS, Shaker IJ. A prosthetic stented aortic homograft for mitral valve replacement. *The Journal of surgical research* 1966;6:548-52.

17. Dotter CT. Transluminally-placed coilspring endarterial tube grafts. Long-term patency in canine popliteal artery. *Investigative radiology* 1969;4:329-32.
18. Palmaz JC, Sibbitt RR, Reuter SR, Tio FO, Rice WJ. Expandable intraluminal graft: a preliminary study. Work in progress. *Radiology* 1985;156:73-7.
19. Sigwart U, Puel J, Mirkovitch V, Joffre F, Kappenberger L. Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *The New England journal of medicine* 1987;316:701-6.
20. Ruygrok PN, Serruys PW. Intracoronary stenting. From concept to custom. *Circulation* 1996;94:882-90.
21. Schatz RA, Baim DS, Leon M, et al. Clinical experience with the Palmaz-Schatz coronary stent. Initial results of a multicenter study. *Circulation* 1991;83:148-61.
22. Nazneen F, Herzog G, Arrigan DW, et al. Surface chemical and physical modification in stent technology for the treatment of coronary artery disease. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2012;100:1989-2014.
23. AFNOR. Alliage à mémoire de forme. 1991.
24. Kathuria YP. The potential of biocompatible metallic stents and preventing restenosis. *Materials Science and Engineering: A* 2006;417:40-8.
25. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO) trial. *Circulation* 2001;103:2816-21.
26. Menown IB, Noad R, Garcia EJ, Meredith I. The platinum chromium element stent platform: from alloy, to design, to clinical practice. *Advances in therapy* 2010;27:129-41.
27. O'Brien BJ, Stinson JS, Larsen SR, Eppihimer MJ, Carroll WM. A platinum-chromium steel for cardiovascular stents. *Biomaterials* 2010;31:3755-61.
28. Balossino R, Gervaso F, Migliavacca F, Dubini G. Effects of different stent designs on local hemodynamics in stented arteries. *Journal of biomechanics* 2008;41:1053-61.
29. Hahn C, Schwartz MA. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis. *Nature reviews Molecular cell biology* 2009;10:53-62.
30. Chatzizisis YS, Coskun AU, Jonas M, Edelman ER, Feldman CL, Stone PH. Role of endothelial shear stress in the natural history of coronary atherosclerosis and vascular remodeling: molecular, cellular, and vascular behavior. *Journal of the American College of Cardiology* 2007;49:2379-93.
31. Butany J, Carmichael K, Leong SW, Collins MJ. Coronary artery stents: identification and evaluation. *Journal of clinical pathology* 2005;58:795-804.
32. Hara H, Nakamura M, Palmaz JC, Schwartz RS. Role of stent design and coatings on restenosis and thrombosis. *Advanced drug delivery reviews* 2006;58:377-86.
33. 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;331:496-501.
34. Gutensohn K, Beythien C, Bau J, et al. In vitro analyses of diamond-like carbon coated stents. Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thrombosis research* 2000;99:577-85.

35. Airoidi F, Colombo A, Tavano D, et al. Comparison of diamond-like carbon-coated stents versus uncoated stainless steel stents in coronary artery disease. *The American journal of cardiology* 2004;93:474-7.
36. Meireles GC, de Abreu LM, Forte AA, Sumita MK, Sumita JH, Aliaga Jdel C. Randomized comparative study of diamond-like carbon coated stainless steel stent versus uncoated stent implantation in patients with coronary artery disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 2007;88:390-5.
37. Antonucci D, Valenti R, Migliorini A, et al. Clinical and angiographic outcomes following elective implantation of the Carbostent in patients at high risk of restenosis and target vessel failure. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2001;54:420-6.
38. Fort S, Kornowski R, Silber S, et al. 'Fused-Gold' vs. 'Bare' stainless steel NIRflex stents of the same geometric design in diseased native coronary arteries. Long-term results from the NIR TOP Study. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2007;3:256-61.
39. Monnink SH, van Boven AJ, Peels HO, et al. Silicon-carbide coated coronary stents have low platelet and leukocyte adhesion during platelet activation. *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 1999;47:304-10.
40. Unverdorben M, Sippel B, Degenhardt R, et al. Comparison of a silicon carbide-coated stent versus a noncoated stent in human beings: the Tenax versus Nir Stent Study's long-term outcome. *American heart journal* 2003;145:e17.
41. O'Brien B, Carroll W. The evolution of cardiovascular stent materials and surfaces in response to clinical drivers: a review. *Acta biomaterialia* 2009;5:945-58.
42. Thyberg J, Hedin U, Sjolund M, Palmberg L, Bottger BA. Regulation of differentiated properties and proliferation of arterial smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 1990;10:966-90.
43. Clowes AW, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. IV. Heparin inhibits rat smooth muscle mitogenesis and migration. *Circulation research* 1986;58:839-45.
44. McKeage K, Murdoch D, Goa KL. The sirolimus-eluting stent: a review of its use in the treatment of coronary artery disease. *American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions* 2003;3:211-30.
45. Burke SE, Kuntz RE, Schwartz LB. Zotarolimus (ABT-578) eluting stents. *Advanced drug delivery reviews* 2006;58:437-46.
46. Ostojic M, Sagic D, Jung R, et al. The pharmacokinetics of Biolimus A9 after elution from the Nobori stent in patients with coronary artery disease: the NOBORI PK study. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2008;72:901-8.
47. Bartorelli AL, Trabattoni D, Fabbicchi F, et al. Synergy of passive coating and targeted drug delivery: the tacrolimus-eluting Janus CarboStent. *Journal of interventional cardiology* 2003;16:499-505.
48. Mani G, Feldman MD, Patel D, Agrawal CM. Coronary stents: a materials perspective. *Biomaterials* 2007;28:1689-710.
49. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial progenitor cell capture by stents coated with antibody against CD34: the HEALING-FIM (Healthy Endothelial Accelerated Lining Inhibits Neointimal Growth-First In Man) Registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;45:1574-9.

50. Waksman R. Drug-eluting stents: from bench to bed. *Cardiovascular radiation medicine* 2002;3:226-41.
51. Poerner TC, Haase KK, Wiesinger B, Wiskirchen J, Duda SH. Drug-coated stents. *Minimally invasive therapy & allied technologies* 2002;11:185-92.
52. Parker T, Dave V, Falotico R. Polymers for drug eluting stents. *Current Pharmaceutical Design* 2010;16:3978-88.
53. Acharya G, Park K. Mechanisms of controlled drug release from drug-eluting stents. *Advanced drug delivery reviews* 2006;58:387-401.
54. Thierry B, Winnik FM, Merhi Y, Silver J, Tabrizian M. Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 2003;4:1564-71.
55. FDA. Premarket approval P020026 SSED Cypher Sirolimus OTW&RxCSS. 2003.
56. FDA. Premarket approval P030025 SSED Taxus Express2 Paclitaxel-Eluting Coronary stent System. 2004.
57. 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;109:701-5.
58. FDA. Premarket approval P070015 SSED Xience V Elerolimms Eluting Coronary Stent System And Promus Everolimus Eluting Coronary Stent. 2008.
59. FDA. Premarket approval P110010 SSED Promus Element Plus Everolimus-Eluting Platinum Chromium Coronary Stent System (Monorail and Over-The-Wire). 2011.
60. Udipi K, Chen M, Cheng P, et al. Development of a novel biocompatible polymer system for extended drug release in a next-generation drug-eluting stent. *Journal of biomedical materials research Part A* 2008;85:1064-71.
61. Maisel WH. *Device Therapy in Heart Failure*: Humana Press; 2010.
62. Sun D, Zheng Y, Yin T, Tang C, Yu Q, Wang G. Coronary drug-eluting stents: From design optimization to newer strategies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2014;102:1625-40.
63. Martin DM, Boyle FJ. Drug-eluting stents for coronary artery disease: a review. *Medical engineering & physics* 2011;33:148-63.
64. Abizaid A, Costa JR, Jr. New drug-eluting stents: an overview on biodegradable and polymer-free next-generation stent systems. *Circulation Cardiovascular interventions* 2010;3:384-93.
65. Chamie D, Costa JR, Jr., Abizaid A, et al. Serial angiography and intravascular ultrasound: results of the SISC Registry (Stents In Small Coronaries). *JACC Cardiovascular interventions* 2010;3:191-202.
66. Garg S, Serruys PW. Coronary stents: looking forward. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:S43-78.
67. Capodanno D, Dipasqua F, Tamburino C. Novel drug-eluting stents in the treatment of de novo coronary lesions. *Vascular health and risk management* 2011;7:103-18.
68. Raber L, Windecker S. Current status of drug-eluting stents. *Cardiovascular therapeutics* 2011;29:176-89.
69. Ranade SV, Miller KM, Richard RE, Chan AK, Allen MJ, Helmus MN. Physical characterization of

controlled release of paclitaxel from the TAXUS Express2 drug-eluting stent. *Journal of biomedical materials research Part A* 2004;71:625-34.

70. Khan W, Farah S, Domb AJ. Drug eluting stents: developments and current status. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2012;161:703-12.

71. Ong AT, McFadden EP, Regar E, de Jaegere PP, van Domburg RT, Serruys PW. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology* 2005;45:2088-92.

72. Rodriguez AE, Mieres J, Fernandez-Pereira C, et al. Coronary stent thrombosis in the current drug-eluting stent era: insights from the ERACI III trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2006;47:205-7.

73. Kuchulakanti PK, Chu WW, Torguson R, et al. Correlates and long-term outcomes of angiographically proven stent thrombosis with sirolimus- and paclitaxel-eluting stents. *Circulation* 2006;113:1108-13.

74. Park DW, Park SW, Park KH, et al. Frequency of and risk factors for stent thrombosis after drug-eluting stent implantation during long-term follow-up. *The American journal of cardiology* 2006;98:352-6.

75. Urban P, Gershlick AH, Guagliumi G, et al. Safety of coronary sirolimus-eluting stents in daily clinical practice: one-year follow-up of the e-Cypher registry. *Circulation* 2006;113:1434-41.

76. Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *The New England journal of medicine* 2002;346:1773-80.

77. Weisz G, Leon MB, Holmes DR, Jr., et al. Five-year follow-up after sirolimus-eluting stent implantation results of the SIRIUS (Sirolimus-Eluting Stent in De-Novo Native Coronary Lesions) Trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2009;53:1488-97.

78. Grube E, Silber S, Hauptmann KE, et al. TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions. *Circulation* 2003;107:38-42.

79. Grube E, Dawkins K, Guagliumi G, et al. TAXUS VI final 5-year results: a multicentre, randomised trial comparing polymer-based moderate-release paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent for treatment of long, complex coronary artery lesions. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2009;4:572-7.

80. Serruys PW, Ong AT, Piek JJ, et al. A randomized comparison of a durable polymer Everolimus-eluting stent with a bare metal coronary stent: The SPIRIT first trial. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2005;1:58-65.

81. 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;362:1663-74.

82. Stone GW, Teirstein PS, Meredith IT, et al. A prospective, randomized evaluation of a novel everolimus-eluting coronary stent: the PLATINUM (a Prospective, Randomized, Multicenter Trial to Assess an Everolimus-Eluting Coronary Stent System [PROMUS Element] for the Treatment of Up to Two de Novo Coronary Artery Lesions) trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2011;57:1700-8.

83. Lev EI, Assali AR, Teplisky I, et al. Comparison of outcomes up to six months of Heparin-Coated with noncoated stents after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 2004;93:741-3.

84. Fajadet J, Wijns W, Laarman GJ, et al. Randomized, double-blind, multicenter study of the Endeavor zotarolimus-eluting phosphorylcholine-encapsulated stent for treatment of native coronary artery lesions: clinical and angiographic results of the ENDEAVOR II trial. *Circulation* 2006;114:798-806.
85. Fajadet J, Wijns W, Laarman GJ, et al. Long-term follow-up of the randomised controlled trial to evaluate the safety and efficacy of the zotarolimus-eluting driver coronary stent in de novo native coronary artery lesions: five year outcomes in the ENDEAVOR II study. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2010;6:562-7.
86. Leon MB, Mauri L, Popma JJ, et al. A randomized comparison of the Endeavor zotarolimus-eluting stent versus the TAXUS paclitaxel-eluting stent in de novo native coronary lesions 12-month outcomes from the ENDEAVOR IV trial. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;55:543-54.
87. Serruys PW, Silber S, Garg S, et al. Comparison of zotarolimus-eluting and everolimus-eluting coronary stents. *The New England journal of medicine* 2010;363:136-46.
88. Taniwaki M, Stefanini GG, Silber S, et al. 4-year clinical outcomes and predictors of repeat revascularization in patients treated with new-generation drug-eluting stents: a report from the RESOLUTE All-Comers trial (A Randomized Comparison of a Zotarolimus-Eluting Stent With an Everolimus-Eluting Stent for Percutaneous Coronary Intervention). *Journal of the American College of Cardiology* 2014;63:1617-25.
89. 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;372:1163-73.
90. Vranckx P, Serruys PW, Gambhir S, et al. Biodegradable-polymer-based, paclitaxel-eluting Infimum stent: 9-Month clinical and angiographic follow-up results from the SIMPLE II prospective multi-centre registry study. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2006;2:310-7.
91. Lemos PA, Moulin B, Perin MA, et al. Randomized evaluation of two drug-eluting stents with identical metallic platform and biodegradable polymer but different agents (paclitaxel or sirolimus) compared against bare stents: 1-year results of the PAINT trial. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2009;74:665-73.
92. Lemos PA, Moulin B, Perin MA, et al. Late clinical outcomes after implantation of drug-eluting stents coated with biodegradable polymers: 3-year follow-up of the PAINT randomised trial. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2012;8:117-9.
93. Abizaid A, Botelho R, Verheye S, et al. CARE II 8 months follow-up results with the CardioMind 0.014" Sparrow sirolimus-eluting nitinol stent system. *Journal of the American College of Cardiology* 2010;56:B53-B.
94. Ormiston JA, Abizaid A, Spertus J, et al. Six-month results of the NEVO Res-Elution I (NEVO RES-I) trial: a randomized, multicenter comparison of the NEVO sirolimus-eluting coronary stent with the TAXUS Liberte paclitaxel-eluting stent in de novo native coronary artery lesions. *Circulation Cardiovascular interventions* 2010;3:556-64.
95. Abizaid A, Ormiston JA, Fajadet J, et al. Two-year follow-up of the NEVO ResElution-I(NEVO RES-I) trial: a randomised, multicentre comparison of the NEVO sirolimus-eluting coronary stent with the TAXUS Liberte paclitaxel-eluting stent in de novo native coronary artery lesions. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2013;9:721-9.

96. Grube E, Schofer J, Hauptmann KE, et al. A novel paclitaxel-eluting stent with an ultrathin abluminal biodegradable polymer 9-month outcomes with the JACTAX HD stent. *JACC Cardiovascular interventions* 2010;3:431-8.
97. Guagliumi G, Sirbu V, Musumeci G, et al. Strut coverage and vessel wall response to a new-generation paclitaxel-eluting stent with an ultrathin biodegradable abluminal polymer: Optical Coherence Tomography Drug-Eluting Stent Investigation (OCTDESI). *Circulation Cardiovascular interventions* 2010;3:367-75.
98. Haude M, Lee SW, Worthley SG, et al. The REMEDEE trial: a randomized comparison of a combination sirolimus-eluting endothelial progenitor cell capture stent with a paclitaxel-eluting stent. *JACC Cardiovascular interventions* 2013;6:334-43.
99. Morice MC, Bestehorn HP, Carrie D, et al. Direct stenting of de novo coronary stenoses with tacrolimus-eluting versus carbon-coated carbostents. The randomized JUPITER II trial. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2006;2:45-52.
100. Grube E. BioFreedom DES Late results, Technology Challenges and Next Steps. Global Summit on Innovations in Interventions. Sao Paulo 2012.
101. McFadden EP, Stabile E, Regar E, et al. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 2004;364:1519-21.
102. Finn AV, Joner M, Nakazawa G, et al. Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: strut coverage as a marker of endothelialization. *Circulation* 2007;115:2435-41.
103. Hofma SH, van der Giessen WJ, van Dalen BM, et al. Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *European heart journal* 2006;27:166-70.
104. Schwartz RS, Chronos NA, Virmani R. Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;44:1373-85.
105. Serruys PW, Daemen J. Are drug-eluting stents associated with a higher rate of late thrombosis than bare metal stents? Late stent thrombosis: a nuisance in both bare metal and drug-eluting stents. *Circulation* 2007;115:1433-9; discussion 9.
106. Joner M, Nakazawa G, Finn AV, et al. Endothelial cell recovery between comparator polymer-based drug-eluting stents. *Journal of the American College of Cardiology* 2008;52:333-42.
107. Basalus MW, Tandjung K, van Westen T, et al. Scanning electron microscopic assessment of coating irregularities and their precursors in unexpanded durable polymer-based drug-eluting stents. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2012;79:644-53.
108. Wiemer M, Butz T, Schmidt W, Schmitz KP, Horstkotte D, Langer C. Scanning electron microscopic analysis of different drug eluting stents after failed implantation: from nearly undamaged to major damaged polymers. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2010;75:905-11.
109. Hoffmann R, Morice MC, Moses JW, et al. Impact of late incomplete stent apposition after sirolimus-eluting stent implantation on 4-year clinical events: intravascular ultrasound analysis from the multicentre, randomised, RAVEL, E-SIRIUS and SIRIUS trials. *Heart* 2008;94:322-8.
110. Hassan AK, Bergheanu SC, Stijnen T, et al. Late stent malapposition risk is higher after drug-eluting stent compared with bare-metal stent implantation and associates with late stent thrombosis. *European heart journal* 2010;31:1172-80.

111. Cook S, Ladich E, Nakazawa G, et al. Correlation of intravascular ultrasound findings with histopathological analysis of thrombus aspirates in patients with very late drug-eluting stent thrombosis. *Circulation* 2009;120:391-9.
112. Kubo T, Akasaka T, Kozuma K, et al. Vascular Response to Drug-Eluting Stent With Biodegradable vs. Durable Polymer. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2014;78:2408-14.
113. Waksman R. Biodegradable stents: they do their job and disappear. *The Journal of invasive cardiology* 2006;18:70-4.
114. Onuma Y, Ormiston J, Serruys PW. Bioresorbable scaffold technologies. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 2011;75:509-20.
115. Nishio S, Kosuga K, Igaki K, et al. Long-Term (>10 Years) clinical outcomes of first-in-human biodegradable poly-L-lactic acid coronary stents: Igaki-Tamai stents. *Circulation* 2012;125:2343-53.
116. Zhang Y, Bourantas CV, Farooq V, et al. Bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease. *Medical devices* 2013;6:37-48.
117. Grube E. The Boston Scientific and REVA Technology. *EuroPCR. Barcelona, Spain*2009.
118. Jabara R, Chronos N, Robinson K. Novel bioabsorbable salicylate-based polymer as a drug-eluting stent coating. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2008;72:186-94.
119. Erdmann L, Macedo B, Uhrich KE. Degradable poly(anhydride ester) implants: effects of localized salicylic acid release on bone. *Biomaterials* 2000;21:2507-12.
120. Cudennec A, Denis C. *Parcours du dispositif médical. Guide pratique: HAS; 2013.*
121. Williams D. *Definitions in Biomaterials. Progress in Biomedical Engineering 4. Amsterdam: Elsevier; 1987:72.*
122. Ratner B, Hoffmann A, Schoen F, Lemons J. *Biomaterials Science, 3rd Edition: Academic Press; 2013.*
123. Matlaga BF, Yasenchak LP, Salthouse TN. Tissue response to implanted polymers: the significance of sample shape. *Journal of biomedical materials research* 1976;10:391-7.
124. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in immunology* 2008;20:86-100.
125. AFNOR. *Biological evaluation of medical devices Part 12: Sample preparation and reference materials*2012.
126. AFNOR. *Biological evaluation of medical devices Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity*2009.
127. AFNOR. *Biological evaluation of medical devices Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*2010.
128. Nakazawa G, Finn AV, Ladich E, et al. Drug-eluting stent safety: findings from preclinical studies. *Expert review of cardiovascular therapy* 2008;6:1379-91.
129. Borisoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *The New England journal of medicine* 2011;364:1746-60.

130. AFNOR. Biological evaluation of medical devices Part 4: Selection of tests for interaction with blood 2009.
131. De Groot CJ, Van Luyn MJA, Van Dijk-Wolthuis WNE, et al. In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials* 2001;22:1197-203.
132. Derkaoui SM, Labbe A, Chevallier P, et al. A new dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on 316L metallic stents enhances endothelial cell coverage. *Acta biomaterialia* 2012;8:3509-15.
133. Derkaoui SM, Avramoglou T, Barbaud C, Letourneur D. Synthesis and characterization of a new polysaccharide-graft-polymethacrylate copolymer for three-dimensional hybrid hydrogels. *Biomacromolecules* 2008;9:3033-8.
134. Anagnostou F, Debet A, Pavon-Djavid G, Goudaby Z, Helary G, Migonney V. Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting *Staphylococcus aureus* adhesion inhibition. *Biomaterials* 2006;27:3912-9.
135. Zemani F, Silvestre JS, Fauvel-Lafeve F, et al. Ex vivo priming of endothelial progenitor cells with SDF-1 before transplantation could increase their proangiogenic potential. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2008;28:644-50.
136. Vanneaux V, Farge-Bancel D, Lecourt S, et al. Expression of transforming growth factor beta receptor II in mesenchymal stem cells from systemic sclerosis patients. *BMJ open* 2013;3.
137. Feldman LJ, Aguirre L, Ziol M, et al. Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2000;101:908-16.
138. Rippstein P, Black MK, Boivin M, et al. Comparison of processing and sectioning methodologies for arteries containing metallic stents. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 2006;54:673-81.
139. McCool B, Murphy L, Tripp CP. A simple FTIR technique for estimating the surface area of silica powders and films. *Journal of colloid and interface science* 2006;295:294-8.
140. Bacakova L, Filova E, Parizek M, Ruml T, Svorcik V. Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants. *Biotechnology advances* 2011;29:739-67.
141. Kim SH, Ha HJ, Ko YK, et al. Correlation of proliferation, morphology and biological responses of fibroblasts on LDPE with different surface wettability. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 2007;18:609-22.
142. An YH, Friedman RJ. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of biomedical materials research* 1998;43:338-48.
143. Christo SN, Diener KR, Bachhuka A, Vasilev K, Hayball JD. Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes. *BioMed research international* 2015;2015:342304.
144. Kim J, Dadsetan M, Ameenuddin S, Windebank AJ, Yaszemski MJ, Lu L. In vivo biodegradation and biocompatibility of PEG/sebacic acid-based hydrogels using a cage implant system. *Journal of biomedical materials research Part A* 2010;95:191-7.
145. Park S, Park M, Kim BH, et al. Acute suppression of TGF- β 1 with local, sustained release of tranilast against the formation of fibrous capsules around silicone implants. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2015;200:125-37.
146. Lee SG, Lee SD, Kim MK, et al. Effect of Antiadhesion Barrier Solution and Fibrin on Capsular Formation After Silicone Implant Insertion in a White Rat Model. *Aesthetic plastic surgery* 2015;39:162-70.

147. Denardo SJ, Carpinone PL, Vock DM, et al. Detailed analysis of polymer response to delivery balloon expansion of drug-eluting stents versus bare metal stents. *EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology* 2013;9:389-97.
148. Shaulov Y, Okner R, Levi Y, et al. Poly(methyl methacrylate) grafting onto stainless steel surfaces: application to drug-eluting stents. *ACS applied materials & interfaces* 2009;1:2519-28.
149. Wang J, He Y, Maitz MF, et al. A surface-eroding poly(1,3-trimethylene carbonate) coating for fully biodegradable magnesium-based stent applications: toward better biofunction, biodegradation and biocompatibility. *Acta biomaterialia* 2013;9:8678-89.
150. Jaguszewski M, Landmesser U. Optical Coherence Tomography Imaging: Novel Insights into the Vascular Response After Coronary Stent Implantation. *Current cardiovascular imaging reports* 2012;5:231-8.
151. Bedair TM, Cho Y, Kim TJ, et al. Reinforcement of interfacial adhesion of a coated polymer layer on a cobalt-chromium surface for drug-eluting stents. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2014;30:8020-8.
152. Choi J, Cho SB, Lee BS, Joung YK, Park K, Han DK. Improvement of interfacial adhesion of biodegradable polymers coated on metal surface by nanocoupling. *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 2011;27:14232-9.
153. Vaudaux P, Avramoglou T, Letourneur D, Lew DP, Jozefonvicz J. Inhibition by heparin and derivatized dextrans of *Staphylococcus aureus* adhesion to fibronectin-coated biomaterials. *Journal of biomaterials science Polymer edition* 1992;4:89-97.
154. Allen RD, Zacharski LR, Widirstky ST, Rosenstein R, Zaitlin LM, Burgess DR. Transformation and motility of human platelets: details of the shape change and release reaction observed by optical and electron microscopy. *The Journal of cell biology* 1979;83:126-42.
155. Milleret V, Ziogas A, Buzzi S, Heuberger R, Zucker A, Ehrbar M. Effect of oxide layer modification of CoCr stent alloys on blood activation and endothelial behavior. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* 2015;103:629-40.
156. de Torre IG, Wolf F, Santos M, et al. Elastin-like recombinamer-covered stents: Towards a fully biocompatible and non-thrombogenic device for cardiovascular diseases. *Acta biomaterialia* 2015;12:146-55.
157. Leszczak V, Popat KC. Improved in vitro blood compatibility of polycaprolactone nanowire surfaces. *ACS applied materials & interfaces* 2014;6:15913-24.
158. Yang Y, Qi P, Wen F, et al. Mussel-inspired one-step adherent coating rich in amine groups for covalent immobilization of heparin: hemocompatibility, growth behaviors of vascular cells, and tissue response. *ACS applied materials & interfaces* 2014;6:14608-20.
159. Ma J, Zhao N, Zhu D. Sirolimus-eluting dextran and polyglutamic acid hybrid coatings on AZ31 for stent applications. *Journal of biomaterials applications* 2015.
160. Mena HA, Lokajczyk A, Dizier B, et al. Acidic preconditioning improves the proangiogenic responses of endothelial colony forming cells. *Angiogenesis* 2014;17:867-79.
161. Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculoprotective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions. *Journal of the American College of Cardiology* 2004;44:733-9.

162. Zilla P, Bezuidenhout D, Human P. Prosthetic vascular grafts: wrong models, wrong questions and no healing. *Biomaterials* 2007;28:5009-27.
163. Inoue T, Croce K, Morooka T, Sakuma M, Node K, Simon DI. Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis. *JACC Cardiovascular interventions* 2011;4:1057-66.
164. Nassiri SM, Rahbarghazi R. Interactions of mesenchymal stem cells with endothelial cells. *Stem cells and development* 2014;23:319-32.
165. Obi S, Masuda H, Akimaru H, et al. Dextran induces differentiation of circulating endothelial progenitor cells. *Physiological reports* 2014;2:e00261.
166. Sedaghat A, Sinning JM, Paul K, Kirfel G, Nickenig G, Werner N. First in vitro and in vivo results of an anti-human CD133-antibody coated coronary stent in the porcine model. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society* 2013;102:413-25.
167. Barsotti MC, Al Kayal T, Tedeschi L, et al. Oligonucleotide biofunctionalization enhances endothelial progenitor cell adhesion on cobalt/chromium stents. *Journal of biomedical materials research Part A* 2015.
168. Naseerali CP, Hari PR, Sreenivasan K. The release kinetics of drug eluting stents containing sirolimus as coated drug: role of release media. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2010;878:709-12.
169. Hu T, Yang J, Cui K, et al. Controlled Slow-Release Drug-Eluting Stents for the Prevention of Coronary Restenosis: Recent Progress and Future Prospects. *ACS applied materials & interfaces* 2015;7:11695-712.
170. Balakrishnan B, Dooley JF, Kopia G, Edelman ER. Intravascular drug release kinetics dictate arterial drug deposition, retention, and distribution. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2007;123:100-8.
171. J. K, D. W, inventors; Method of tacrolimus extraction and quantification using aqueous detergents. USA2009 18/08/2009.
172. Maurel B, Sarraf C, Bakir F, et al. A New Hemodynamic Ex Vivo Model For Medical Devices Assessment. *Annals of vascular surgery* 2015.
173. Tepe G, Dietrich T, Grafen F, et al. Reduction of intimal hyperplasia with Re-188-labeled stents in a rabbit model at 7 and 26 weeks: an experimental study. *Cardiovascular and interventional radiology* 2005;28:632-7.
174. Nakazawa G, Finn AV, Joner M, et al. Delayed arterial healing and increased late stent thrombosis at culprit sites after drug-eluting stent placement for acute myocardial infarction patients: an autopsy study. *Circulation* 2008;118:1138-45.
175. Katz G, Harchandani B, Shah B. Drug-eluting stents: the past, present, and future. *Current atherosclerosis reports* 2015;17:485.
176. Mennuni MG, Pagnotta PA, Stefanini GG. Coronary Stents: The Impact of Technological Advances on Clinical Outcomes. *Annals of biomedical engineering* 2015.
177. Foin N, Lee RD, Torii R, et al. Impact of stent strut design in metallic stents and biodegradable scaffolds. *International journal of cardiology* 2014;177:800-8.
178. Sanchez OD, Yahagi K, Byrne RA, et al. Pathological aspects of bioresorbable stent implantation.

EuroIntervention : journal of EuroPCR in collaboration with the Working Group on Interventional Cardiology of the European Society of Cardiology 2015;11 Suppl V:V159-65.

179. Kawase Y, Hoshino K, Yoneyama R, et al. In vivo volumetric analysis of coronary stent using optical coherence tomography with a novel balloon occlusion-flushing catheter: a comparison with intravascular ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology* 2005;31:1343-9.

180. Tobis J. Which do you prefer, OCT or IVUS? *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 2015;86:236.

181. 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;94:1690-7.

182. Wiebe J, Nef HM, Hamm CW. Current status of bioresorbable scaffolds in the treatment of coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2014;64:2541-51.

183. Caiazzo G, Kilic ID, Fabris E, et al. Absorb bioresorbable vascular scaffold: What have we learned after 5years of clinical experience? *International journal of cardiology* 2015;201:129-36.

184. Werner M, Micari A, Cioppa A, et al. Evaluation of the biodegradable peripheral Igaki-Tamai stent in the treatment of de novo lesions in the superficial femoral artery: the GAIA study. *JACC Cardiovascular interventions* 2014;7:305-12.

185. Koppa T, Cheng Q, Yahagi K, et al. Thrombogenicity and early vascular healing response in metallic biodegradable polymer-based and fully bioabsorbable drug-eluting stents. *Circulation Cardiovascular interventions* 2015;8:e002427.

186. Baskin JL, Pui CH, Reiss U, et al. Management of occlusion and thrombosis associated with long-term indwelling central venous catheters. *Lancet* 2009;374:159-69.



**BUREAU DE LA RECHERCHE
ET DES ETUDES DOCTORALES**

CATALOGUE DES THESEES SOUTENUES

Doctorat d'Université

SPECIALITE Sciences de l'ingénieur me. génie biomédical

Nom DELATTRE Epouse

Prénom Cécilia

Date et Heure de soutenance 9/11/2015 à 14h00

TITRE DE LA THESE

Mise au point d'un nouveau revêtement de stent pour application cardiovasculaire

DIRECTEUR DE THESE : M LETOURNEUR Didier

MEMBRES DU JURY.....

NOM	PRENOM	GRADE	ETABLISSEMENT
1) Mme JAFFRE Christelle Professeur			
2) M PAUTHE Emmanuel Professeur Université de Cergy-Pontoise			
3) Mme BOISSON VIDAL Catherine Docteur Université Paris Descartes			
4) Mme PELLE Anne Professeur Université Paris Nord			
5) M LETOURNEUR Didier Docteur Université Paris Nord			
6)			
7)			
8)			
*(MI)			
(MI)			

*MI -Membre Invité(e)

RÉSUMÉ

Mise au point d'un nouveau revêtement de stent pour application cardiovasculaire

L'objectif de ce travail est d'évaluer la biocompatibilité d'un copolymère de Dextrane-Polybutylmethacrylate utilisé comme revêtement de stent métallique en Cobalt-Chrome. L'étude s'est déroulée en trois phases : 1/La production du polymère et la caractérisation physico-chimique, 2/L'évaluation *in vitro* et 3/L'évaluation *in vivo* dans plusieurs modèles.

Dans un premier temps deux copolymères de concentrations distinctes ont été synthétisés et mis en forme pour les différentes expériences. Leur caractérisation par FTIR, mesure d'angle de contact et une première implantation *in vivo* évaluant la réaction à corps étranger ont permis d'en sélectionner un : le Dex-PBMA. Aucune réaction inflammatoire chronique n'a été observée. Des épreuves dynamiques et une observation des stents recouverts au MEB ont permis de confirmer la présence et la tenue du film de Dex-PBMA sur les stents. Des tests *in vitro* ont montré une faible adhésion bactérienne et plaquettaire ainsi qu'une thrombogénicité modérée. Un dispositif sous flux *ex vivo* et l'utilisation d'une molécule modèle - le Tacrolimus - ont montré la possibilité d'utiliser le Dex-PBMA comme plateforme de libération de substances. *In vitro*, l'adhésion et la prolifération des progéniteurs endothéliaux ainsi que des cellules souches mésenchymateuses étaient faibles mais aucun effet toxique n'a été noté. Finalement les stents recouverts de Dex-PBMA ont été implantés *in vivo* dans un modèle d'aorte saine de rat puis dans un modèle de resténose chez le lapin. Chez le rat, après 30 jours, une hyperplasie limitée, l'absence de macrophage et une réendothélialisation des mailles ont été observées. Les premières implantations chez le lapin ont confirmé ces tendances mais l'étude doit être élargie afin d'obtenir un résultat significatif.

En conclusion, ces données démontrent que le Dex-PBMA est un matériau intéressant pour le revêtement de stent.

Design of a new stent coating for cardiovascular application

The purpose of this work was to study the biocompatibility of a dextran-graft-polybutylmethacrylate copolymer coated on cobalt chromium metallic stent. This study was divided in 3 parts: 1/the production of the copolymer and its physico-chemical characterization; 2/ its *in vitro* evaluation and 3/ its *in vivo* evaluation in several models.

In the first step, 2 copolymers with different concentrations were synthesized and shaped for the following experiments. Their FTIR examination, contact angle measurement and a first *in vivo* implantation to evaluate foreign body reaction lead to the selection of one copolymer: the Dex-PBMA. No chronic inflammatory reaction was noticed. Dynamic tests and SEM observations of coated stents confirmed the presence and the resistance of the Dex-PBMA coating. *In vitro* tests showed both low bacterial and platelet adhesions and a moderate thrombogenicity. An *ex vivo* test under flow with a model molecule - the Tacrolimus - showed the ability of Dex-PBMA to deliver drug. *In vitro*, the human endothelial progenitors and mesenchymal stem cells adhesion and proliferation were low but didn't reveal any toxic effect. Finally Dex-PBMA coated stent were implanted *in vivo* in a healthy rat aorta model of stenting then in a rabbit model of restenosis. In rat, the intimal hyperplasia was moderate and an endothelium was present 30 days after stent implantation. First rabbit implantation confirmed these trends nevertheless this study must be extended to obtain significant results. In conclusion, these data demonstrate that Dex-PBMA is an interesting material for stent coating.