



**HAL**  
open science

# Conception et évaluation d'un stent actif pro-cicatrisant basé sur la polydopamine, un polymère biocompatible et bioinspiré

Adrien Hertault

## ► To cite this version:

Adrien Hertault. Conception et évaluation d'un stent actif pro-cicatrisant basé sur la polydopamine, un polymère biocompatible et bioinspiré. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS031 . tel-02614158

**HAL Id: tel-02614158**

**<https://theses.hal.science/tel-02614158>**

Submitted on 20 May 2020

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

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



**Université de Lille – Faculté de Médecine  
Ecole Doctorale Biologie Santé**

## **THESE**

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Lille  
Discipline : Sciences de la vie et de la santé

### **Conception et évaluation d'un stent actif pro-cicatrisant basé sur la polydopamine, un polymère biocompatible et bioinspiré**

Présentée et soutenue publiquement par  
**Adrien HERTAULT**  
**Le 25 Octobre 2019**

#### **Membres du Jury**

Pr Jonathan SOBOCINSKI	Directeur
Pr Nabil CHAKFE	Rapporteur
Pr Elixène JEAN-BAPTISTE	Rapporteur
Pr Stéphane HAULON	Examineur
Dr Joel LYSKAWA	Examineur
Dr Nicolas BLANCHEMAIN	Examineur



## REMERCIEMENTS

Au Professeur Nabil CHAKFE,

*Merci pour vos encouragements et votre soutien. Merci de me donner l'opportunité de découvrir et de participer aux innombrables projets dont fourmille le GEPROVAS. Merci de votre accueil chaleureux à chacune de mes venues à Strasbourg. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.*

Au Professeur Elixène JEAN-BAPTISTE,

*Merci pour votre bienveillance tout au long de cette (longue) thèse et pour vos conseils judicieux. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.*

Au Professeur Stéphan HAULON,

*Merci. De m'avoir appris. De m'avoir aidé. De m'avoir poussé. De m'avoir soutenu. Et de continuer à le faire. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.*

Au Professeur Jonathan SOBOCINSKI,

*Merci de ton encadrement et de tes conseils lors de la direction de ce travail.*

Au Docteur Nicolas BLANCHEMAIN,

*Merci de m'avoir accueilli au sein du GRB, de m'avoir guidé et en même temps de m'avoir laissé une liberté précieuse. Merci pour tes conseils et ton soutien. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.*

Au Docteur Joël LYSKAWA,

*Merci d'avoir pris le temps de m'accueillir au sein de l'UMET. Merci de m'avoir fait profiter de ton expertise, loin de mon champ de connaissance initial. Merci de me faire l'honneur de juger ce travail.*

A Diane et Mathieu,

*Pour avoir transformé ma vie. Pour avoir repoussé les limites du possible. Je vous souhaite encore de belles aventures. Je vous aime.*

*Of course, special thanks to Jaclyn & the Campbell family, who made this dream into reality. I (We) love you.*

A ma famille,

*Nous ne sommes pas toujours d'accord, mais toujours là les uns pour les autres. Je crois que c'est la plus belle définition de la famille. Je vous aime.*

A mes amis,

*La liste de ceux que je souhaite remercier est longue, excusez-moi par avance de ne pas le faire de manière individuelle – J'espère vous faire part de ma gratitude au quotidien et pouvoir continuer à traverser les joies et les épreuves de la vie à vos côtés. Vous aussi, je vous aime.*

Au Docteur Blandine MAUREL,

*Je te dois beaucoup. Pour tes enseignements, chirurgicaux ou scientifiques, pour tes encouragements, professionnels ou personnels. Travailler à tes côtés est toujours une chance et un plaisir.*

A Mickael MATON et Feng CHAI, et plus généralement à l'équipe du GRB (et Justine Mouglin, Nicolas Bricout, Florent Briffa).

*Sans vous ce travail n'aurait pas été possible. Merci pour le temps passé à mes côtés, pour les repas sautés, les WE à l'animalerie. Merci pour vos remarques et vos conseils, ou tout simplement pour les moments partagés ensemble. J'estime avoir eu beaucoup de chance de travailler avec vous.*

A mes amis et collègues, Aurélia (collègue, amie, famille, je ne sais plus où te mettre !), Hovan, Sébastien et Bruno.

*Quelle chance de travailler avec vous ! Merci de votre enthousiasme et de votre bonne humeur au quotidien.*

*Sans oublier un grand merci nos équipes, dans le service ou au bloc bien sûr !*

## LEXIQUE

AntiCD34-SES : AntiCD34 and Sirolimus Eluting Stent

AES: Arsenic Trioxide Eluting Stent

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAS : Bioactive Stent – Stent Bio-actif

BES : Biolimus-eluting stent

BMS : Bare metal stent – stent nu

BP : Bioabsorbable Polymer – Polymère résorbable

BVS : Bioadsorbable Vascular Scaffold – Stent résorbable

CDK : CyclinDependent Kinase

CLI : Critical Limb Ischemia – Ischémie critique des membres inférieurs

CrCo : Chrome-Cobalt

DEB: Drug-eluting balloon – Ballon actif

DES : Drug-eluting stent – Stent actif

DOCE : Device-oriented composite endpoint

DP : Durable Polymer – Polymère non-résorbable

EC: Endothelial cells – Cellules endothéliales

EDC : carbodiimide

EDS : Energy Dispersive X-ray Spectroscopy - Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie

EES : Everolimus-eluting stent

ELISA : Enzyme-Linked Immuno Assay – Méthode de dosage d'immunoabsorption par enzyme liée

ePTFE : Polytétrafluoroéthylène expansé

Hep : Héparine

HPLC : Chromatographie Haute Performance en Phase Liquide

HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells

HUASMC : Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells - Cellule musculaire lisse humaine d'artère de cordon ombilical

HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell – Cellule endothéliale humaine de veine de cordon ombilical

ID/CI-TLR/TVR: Ischemia-driven/clinically-indicated Target Lesion/Vessel Revascularization

ISR : In-Stent Restenosis – Resténose intra-stent

LDH: Lactate déshydrogénase (enzyme)

MACE: Major Adverse Cardiac Event – Événement cardiaque indésirable majeur

MACCE : Major Adverse Cardiac or Cerebrovascular Event - Événement cardiaque et/ou cérébro-vasculaire indésirable majeur

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

MCV : Maladies Cardio-vasculaires

NES : Novolimus Eluting Stent

NHS : N-Hydroxysuccinimide

NiTi : Alliage de NiTiNOL (Nickel, Titane)

OCT : Optical coherence Tomography - Tomographie par cohérence optique

PBMA : Poly(butyl methacrylate)

PC : Platinium-Cobalt

PCD: Polycyclodextrine

PCL: Polycaprolactone

PDA: Polydopamine

PEI : Poly(éthylène imine)

PES : Paclitaxel Eluting Stent

PF : Polymer-Free – sans polymère

PICC : Alliage de Platiniun, Iridium et Chrome-Cobalt

PLGA : Poly(lactic-co-glycolic acid)

PLLA : Poly-Lactic L-Acid - Acide Poly(L-lactique)

POCE: Patient-oriented Composite Endpoint

PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses

PRP : Plasma riche en plaquettes

PTA : Percutaneous Transluminal Angioplasty - Angioplastie transluminale

PU : Polyuréthane

QCA : coronarographie quantitative

RES : Ridafarolimus Eluting Stent

STEMI: Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST

SES: Sirolimus-eluting stent

SFA : Superficial femoral artery - Artère fémorale superficielle

SMC: Smooth Muscular Cells – Cellules musculaires lisses

SPES: Sirolimus and Probuocol Eluting Stent

SS : Stainless Steel – Acier inoxydable

TAT : Thromboses Aigues Tardives

TLV/TLF : Target lesion/vessel failure

UV: Ultra-Violet

XPS: Spectroscopie photoélectronique aux rayons X

ZES: Zotarolimus Eluting Stent

## TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>3</b>
<b>LEXIQUE.....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>7</b>
<b>CHAPITRE 1: INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>9</b>
1.1. Athérosclérose et Principes du traitement .....	9
1.2. Resténose intra-stent.....	10
1.3. Concept et limites des stents actifs.....	11
<b>2. Apport clinique des stents actifs - Revue de la littérature .....</b>	<b>15</b>
2.1. Matériel et méthodes .....	15
2.2. Résultats.....	20
2.3. Discussion.....	67
2.4. Conclusion .....	71
<b>3. Pistes de recherche et voies de développement .....</b>	<b>71</b>
3.1. Les plateformes résorbables .....	71
3.2. Les polymères bioinspirés .....	73
3.3. Les systèmes « polymer-free ».....	74
3.4. Les principes actifs innovants et la thérapie ciblée.....	74
<b>4. Hypothèses de travail.....</b>	<b>77</b>
<b>CHAPITRE 2: UN POLYMERE BIOISNPIRE ET BIOCOMPATIBLE, LA POLYDOPAMINE .....</b>	<b>79</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>79</b>
<b>2. Produits, Matériels et Méthodes.....</b>	<b>81</b>
2.1. Produits.....	81
2.2. Matériel et Méthodes .....	81
<b>3. Résultats.....</b>	<b>91</b>
3.1. Caractérisation de surface.....	91
3.2. Expérimentations <i>in-vitro</i> .....	91
3.3. Evaluation <i>in-vivo</i> .....	95
<b>4. Discussion .....</b>	<b>98</b>
<b>5. Conclusion intermédiaire.....</b>	<b>103</b>
<b>CHAPITRE 3 : VERS UNE PLATEFORME VERSATILE .....</b>	<b>105</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>105</b>
<b>2. Produits, Matériels et Méthodes.....</b>	<b>106</b>
2.1. Produits.....	106
2.2. Matériel et Méthodes .....	107
<b>3. Résultats.....</b>	<b>112</b>
3.1. Choix du donneur d'amines et de la stratégie d'enrichissement.....	112
3.2. Caractérisation de surface.....	113
3.3. Cytocompatibilité .....	115



4. Discussion .....	116
5. Conclusion intermédiaire.....	121
<b>CHAPITRE 4: UN STENT PRO-CICATRISANT A L'HEMINE.....</b>	<b>123</b>
1. Introduction.....	123
2. Produits, Matériels et Méthodes.....	124
2.1. Produits .....	124
2.2. Matériel et Méthodes .....	125
2.2.1. Préparation des échantillons .....	125
2.2.2. Validation de l'immobilisation d'hémine .....	126
2.2.3. Quantification de l'hémine greffée.....	128
2.2.4. Expérimentations <i>in-vitro</i> - Cytocompatibilité.....	128
2.2.5. Expérimentations <i>in-vivo</i> .....	130
2.2.6. Analyses statistiques.....	137
3. Résultats.....	138
3.1. Analyse qualitative indirecte du greffage de l'hémine.....	138
3.2. Analyse qualitative directe du greffage .....	138
3.3. Analyse quantitative du greffage de l'hémine .....	141
3.4. Expérimentations <i>in-vitro</i> .....	141
3.5. Expérimentations animales.....	143
4. Discussion .....	148
5. Conclusion intermédiaire.....	153
<b>DICUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....</b>	<b>154</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>158</b>
<b>REFERENCES .....</b>	<b>160</b>
<b>RESUME.....</b>	<b>183</b>

# CHAPITRE 1: INTRODUCTION GENERALE

## 1. Introduction

### 1.1. Athérosclérose et Principes du traitement

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde (17.3 millions de décès par an, soit 30% de la mortalité mondiale annuelle). Elles découlent d'une dysfonction des cellules endothéliales, responsable d'une altération de la paroi vasculaire appelée athérosclérose. Il s'agit d'une accumulation anormale de lipides dans la paroi, entraînant une réponse immuno-inflammatoire avec prolifération anormale des cellules musculaires lisses vasculaires (SMC), aboutissant à la formation d'une plaque réduisant la lumière du vaisseau. Ce phénomène est appelé sténose (1,2). Il entraîne une diminution du flux sanguin en aval, et donc une hypo-perfusion des organes, responsable des symptômes ressentis par les patients (angor au niveau cardiaque, claudication au niveau des membres inférieurs par exemple). La prise en charge thérapeutique des maladies cardiovasculaires est basée sur la prévention et le contrôle des facteurs de risque cardio-vasculaire, par le respect de règles hygiéno-diététiques et par l'introduction d'un traitement médical au besoin. Cependant, en cas de lésions symptomatiques, il est souvent nécessaire de compléter le traitement par un geste chirurgical. Classiquement, le flux est restauré par ablation de la plaque (endartériectomie) ou dérivation du flux sanguin (pontage). Plus récemment sont apparues des techniques dites « endovasculaires », c'est-à-dire passant par l'intérieur des vaisseaux. Elles sont peu invasives, et engendrent moins de complications que le traitement chirurgical conventionnel (chirurgie dite « ouverte »). Parmi ces techniques, on retrouve principalement l'angioplastie-stenting qui consiste à remodeler la paroi avec un ballonnet, puis à renforcer la réparation à l'aide d'un échafaudage métallique appelé stent. Il est actuellement démontré dans la plupart des territoires vasculaires que l'implantation d'un stent diminue le risque de resténose en comparaison à l'angioplastie au ballonnet seule (3,4).

## 1.2. Resténose intra-stent

Bien que l'adjonction d'un stent ait permis de limiter les récives après angioplastie, on constate un taux de Resténose Intra-Stent (RIS) après implantation de l'ordre de 20-30% dans les territoires coronaires (5), et pouvant atteindre jusqu'à 50% au niveau des artères intrapoplitées (6). Les mécanismes impliqués dans la RIS sont classés en deux phases :

- i) La phase précoce : Les contraintes physiques imposées à la paroi par le stent, le dénudement de l'endothélium et le traumatisme de la media secondaires à l'implantation engendrent une réaction inflammatoire locale (7). Il en résulte une activation plaquettaire autour de la zone lésée, avec expression de molécules d'adhésion, tel que la P-sélectine, qui vont favoriser le recrutement de cellules inflammatoires (polynucléaires neutrophiles, monocytes et macrophages). Ces cellules vont sécréter une quantité importante de cytokines (Interféron  $\alpha$  (INF $\alpha$ ), Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukine 6 (IL-6), etc...) et de facteurs de croissance (entre autre le Tumor Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1)) qui vont entraîner la prolifération et la migration des SMC. La régulation de la prolifération des SMC s'effectue selon 2 voies principales : celle des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) p42/44 ; et celle de la Serine/Thréonine Kinase Akt (8). De nombreuses interactions existent également avec p38 (9) et les CDK (CyclinDependent Kinase) p21 et p27kip, qui sont pour leur part impliquées dans l'inhibition des facteurs de la prolifération (10,11).
- ii) La phase tardive : Les SMC recrutées à la phase précoce acquièrent un phénotype pathologique suite à la stimulation excessive en facteurs de croissance. Ceci va engendrer une prolifération et une migration des SMC vers

la néointima, puis une synthèse de matrice extracellulaire, aboutissant à une hyperplasie myo-intimale (8). Lorsque ces phénomènes de cicatrisation sont excessifs, ils se traduisent par la survenue d'une RIS.

La RIS est responsable d'une récurrence de la symptomatologie chez les patients, et est susceptible de se compliquer par un phénomène de thrombose aiguë. Il en résulte une morbi-mortalité importante, et une augmentation des dépenses de santé. A l'échelle mondiale, la RIS est un problème majeur de santé publique.

### 1.3. Concept et limites des stents actifs

Afin de limiter la RIS, il a été proposé d'enduire les stents de principes actifs limitant la prolifération des cellules musculaires lisses. Ces stents ont été appelés « actifs » (Drug-eluting stent, DES), par opposition aux stents « nus » utilisés jusqu'alors. *In-vivo*, sur modèle animal, les stents enduits de sirolimus ont démontré une réduction significative de la prolifération myo-intimale (12). En 2003, la Food and Drug Administration autorisait la mise sur le marché du stent actif Cypher® (Cordis Corporation, Miami, FL), libérant du sirolimus, puis en 2004 du stent TAXUS™ (Boston Scientific, Natick, MA, USA), libérant du paclitaxel. L'évaluation de ces stents au niveau coronaire chez l'homme a démontré leur efficacité sur la RIS, avec une incidence passant de 26,6% à 7,9% après 9 mois entre un stent nu et le stent Taxus® (13), et de 21,3% à 5,8% après 2 ans entre un stent nu et le stent Cypher® (14). Cependant, malgré l'amélioration constatée sur la RIS, des phénomènes de thromboses aiguës tardives (TAT) ont été observées, avec des conséquences cliniques parfois fatales pour les patients.

Deux mécanismes ont été incriminés dans les TAT :

- Un retard de cicatrisation de la paroi vasculaire, lié au caractère non sélectif des drogues cytotoxiques utilisées, qui limitent la prolifération des cellules musculaires

lisses, mais également des cellules endothéliales (15). Il en découle une réendothélialisation partielle des mailles du stent, dont une partie reste exposée au flux sanguin dans la lumière artérielle et engendre des phénomènes d'agrégation plaquettaire aboutissant à la thrombose.

- Des phénomènes d'hypersensibilité aux polymères non résorbables employés dans la conception des premiers DES (16), responsables d'une réaction inflammatoire locale aboutissant à un remodelage aberrant de la paroi et à un risque accru de thrombose.

De ce fait, les stents actifs de première génération n'ont pas démontré leur supériorité en termes de morbi-mortalité en comparaison aux stents nus (17), et le stent Cypher® a été retiré du marché en 2013. De plus, ils imposent la prise d'antiagrégants plaquettaires au long cours pour prévenir la TAT, avec un risque de complications hémorragiques.

Trois grands axes de recherche scientifique sont actuellement développés afin d'optimiser les stents et limiter la RIS et la TAT :

- La plateforme, c'est-à-dire le stent en lui-même. La plupart des stents commercialisés sont en acier inoxydable, en alliage de chrome-cobalt (CrCo) ou en NiTiNOL (alliage de Titane et Nickel). Des stents résorbables, permettant de limiter l'irritation de la paroi vasculaire au long cours, sont en phase d'évaluation. Les résultats préliminaires des études cliniques, en particulier avec des stents en acide poly(L-lactique) (PLLA) étaient encourageants (18). Un premier stent (Absorb®, AbbotVascular, AbbottPark, IL) a été commercialisé, mais les résultats définitifs de ces essais cliniques ont été mitigés (augmentation du taux de thrombose de stent et d'infarctus du myocarde), entraînant son retrait.

- Le polymère qui transporte et définit la cinétique de libération du principe actif. Suite aux problèmes d'hypersensibilité rencontrés avec les polymères non résorbables, les dernières générations de stents n'utilisent pas de polymères (Principe actif adsorbé sur la plateforme comme pour le Zilver PTX®, CookMedical) ou des polymères biocompatibles totalement résorbables (par exemple, le stent Biomatrix®, Biosensor Europe au PLLA).
- Le principe actif : La recherche s'oriente vers l'utilisation de drogues pro-cicatrisantes, plutôt que des drogues cytotoxiques, qui inhiberaient sélectivement la prolifération des SMC tout en conservant ou en favorisant la réponse endothéliale.

Les DES de deuxième génération ont été conçus selon ces concepts (sauf ne ce qui concerne le choix du principe actif). Ces stents utilisent des polymères biorésorbables et/ou biocompatibles, combinées avec d'autres molécules thérapeutiques, la plupart appartenant à la famille des limus, telles que le zotarolimus (ENDEAVOR®, Medtronic, Santa Rosa, CA) ou l'éverolimus (PROMUS®, Boston Scientific, Natick, MA et XIENCE®, AbbotVascular, AbbottPark, IL). Ils possèdent notamment des cinétiques de libération plus rapides, et une efficacité accrue, permettant de diminuer les concentrations locales. Ces stents, dits de « seconde génération », semblent présenter des résultats cliniques supérieurs à ceux rencontrés avec les stents actifs de première génération (19). La troisième génération de DES est basée sur des plateformes résorbables (en Poly(L-lactic acid) (PLLA)(18) ou en magnésium(20)), sur des stents sans polymères (polymer-free) ou sur des classes thérapeutiques n'appartenant pas aux cytotoxiques (probucol, antiCD34).



## 2. Apport clinique des stents actifs - Revue de la littérature

Cette revue de la littérature a pour but d'évaluer le niveau de preuve clinique disponible sur l'utilisation des DES actuellement commercialisés dans divers territoires vasculaires (coronaires, artères fémorales superficielles (SFA) et artères sous le genou (BTK)) et de discuter leurs potentiels et limites.

### 2.1. Matériel et méthodes

Cette revue systématique a été réalisée selon les critères PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (21).

#### *Stratégie de recherche*

Une revue de la littérature était effectuée via les bases de données Pubmed/Medline avec le terme MeSH "Drug-Eluting Stents" et les filtres "Clinical Trial", "5 years", "English language" et "humans". La liste des résumés était examinée par deux lecteurs indépendants (A. Hertault, E. Lerisson) afin de sélectionner les études pertinentes en fonction des critères d'inclusion/exclusion. Les textes complets étaient ensuite récupérés et analysés par les deux enquêteurs.

#### *Critères d'inclusion/exclusion*

Tous les essais randomisés, ou méta-analyses d'essais randomisés, incluant des patients ayant fait l'objet d'un suivi d'au moins un an, avec un critère de jugement clinique étaient considérés admissibles. Les articles étaient examinés afin d'identifier les critères de jugement cliniques suivants :



- Au niveau coronaire :

- **Major Adverse Cardiac Event (MACE)** – ou événement cardiaque indésirable majeur, communément défini comme un critère d'évaluation composite incluant la mortalité (toutes causes confondues) et/ou tout infarctus du myocarde et/ou toute récurrence de symptôme liée à la lésion ou au vaisseau initialement traité (target lesion/vessel failure, TLF/TVF).
- **MACCE** - Événement cardiaque et/ou cérébro-vasculaire indésirable majeur, habituellement défini comme MACE et/ou tout accident vasculaire cérébral (AVC) majeur.
- **Target Lesion/Vessel Failure (TLF/TVF)** – Définis comme la récurrence de symptôme liée à la lésion ou au vaisseau initialement traité (stenté), y compris la mort de cause cardiaque, l'infarctus du myocarde lié au vaisseau cible ou la revascularisation de la lésion cible pour ischémie.
- **Ischemia-driven/clinically-indicated Target Lesion/Vessel Revascularization (ID/CI-TLR/TVR)** – Définis comme toute revascularisation de lésion/vaisseau cible consécutive à la preuve clinique d'une ischémie du territoire d'aval ou l'émergence de nouveaux symptômes dans le même territoire.
- **Device-oriented composite endpoint (DOCE)** – défini comme un critère d'évaluation composite axé sur les événements liés au matériel (stent) associant la mortalité de cause cardiaque, l'infarctus du myocarde dans le territoire cible ou la revascularisation itérative de la lésion cible sur des critères cliniques.
- **Patient-oriented Composite Endpoint (POCE)** défini comme un critère d'évaluation composite axé sur les événements liés au patient associant toutes les causes de décès, tout infarctus du myocarde ou toute revascularisation cardiaque.

- Aux membres inférieurs :

- **Sauvetage de membre** ou survie sans amputation majeure
- **Cicatrisation** des plaies
- **Amélioration de la classification de Rutherford**

Les études observationnelles, les registres, les études ne faisant état que de résultats morphologiques ou hémodynamiques sans critères de jugement cliniques et les résumés sans texte intégral étaient exclus. Lorsqu'une étude présentait un ou des rapports antérieurs à la période de recherche initialement définie, les articles en question étaient récupérés et analysés.

#### *Extraction des données*

Les données suivantes étaient extraites à partir des articles sélectionnés: année de publication, type d'étude (essai randomisé, analyse post-hoc d'un essai randomisé ou méta-analyse d'essais randomisés), type de population traitée, soutien financier de l'industrie, groupes étudiés (type de stent comparé), durée du suivi, critères de jugement principal clinique (comme définis ci-dessus), éventuellement critères de jugement cliniques secondaires lorsque l'étude était conçue avec un critère primaire non clinique, résultats principaux et conclusion des auteurs.

#### *Répartition des études identifiées*

Les études sélectionnées étaient classées selon le territoire traité (coronariens, SFA, BTK), puis divisées en trois catégories selon les différents aspects étudiés : Principe actif, polymère ou plateforme. Si une étude comparant des DES avec différentes plateformes, différents polymères et/ou différents principes actifs, elle était classée dans les trois catégories. Une nomenclature spécifique (Table 1.1) était élaborée pour faciliter la classification.

Platform	
SS	Stainless Steel
CC	Cobalt Chromium
PC	Platinum Chromium
PICC	Platinum Iridium and Cobalt chromium
NiTi	NiTINOL
BAS	Bioactive Stent (including metallic surface activated with titanium-nitride-oxide)
BVS	Bioadsorbable Vascular Scaffold (Including polymeric scaffolds and magnesium alloy)

Polymers	
DP	Durable Polymer
BP	Bioadsorbable Polymer
PF	Polymer Free

Stents / Drugs	
PES	Paclitaxel Eluting Stent
SES	Sirolimus Eluting Stent
EES	Everolimus Eluting Stent
ZES	Zotarolimus Eluting Stent
BES	Biolimus Eluting Stent
RES	Ridafarolimus Eluting Stent
NES	Novolimus Eluting Stent
AntiCD34-SES	AntiCD34 and Sirolimus Eluting Stent
SPES	Sirolimus and Probucol Eluting Stent
AES	Arsenic Trioxide Eluting Stent
Hep	Heparin

Table 1.1: Nomenclature utilisée dans cette revue pour identifier et répartir les différents types de stents en fonction du principe actif, du polymère et de la plateforme.

Selon cette classification, le stent Cypher® (Cordis Corporation, Miami, FL), basé sur une plateforme en acier inoxydable libérant du sirolimus via un polymère non résorbable était classé SS-DP-SES. Les DES étaient également classés en fonction de leur génération. La limite entre la deuxième et la troisième génération étant souvent vague et fondée sur des arguments commerciaux, elle était définie par les sauts technologiques pour les besoins de cette revue :

- **Première génération** : Uniquement Cypher® (Cordis) et Taxus® (Boston Scientific),

- **Deuxième génération** : Inclut les DES avec des polymères non-résorbables ou résorbables libérant des molécules cytotoxiques, essentiellement de la famille des limus,
- **Troisième génération** : Comprend les échafaudages (scaffolds) vasculaires résorbables, les plateformes sans polymère (polymer-free) ou les DES libérant des principes actifs pro-cicatrisants.

## 2.2. Résultats

La recherche était conduite le 31 mars 2019 selon le diagramme de flux présenté en Figure 1.1. Sept-cent quarante-trois résumés étaient identifiés et évalués pour déterminer leur éligibilité. Parmi eux, 206 études répondaient aux exigences initiales et étaient incluses. Vingt-sept études présentaient des rapports antérieurs à la période de recherche, ce qui représentait 30 articles supplémentaires éligibles. Soixante-cinq articles étaient exclus après lecture du texte intégral, principalement parce que ces études étaient conçues pour étudier des problématiques en dehors du spectre de cette revue (comparaison aux ballons actifs, n=15, aux pontages coronariens, n=10) ou évaluer l'efficacité des DES dans un contexte anatomique propre à la cardiologie interventionnelle (stenting de la bifurcation coronaire, n=16).

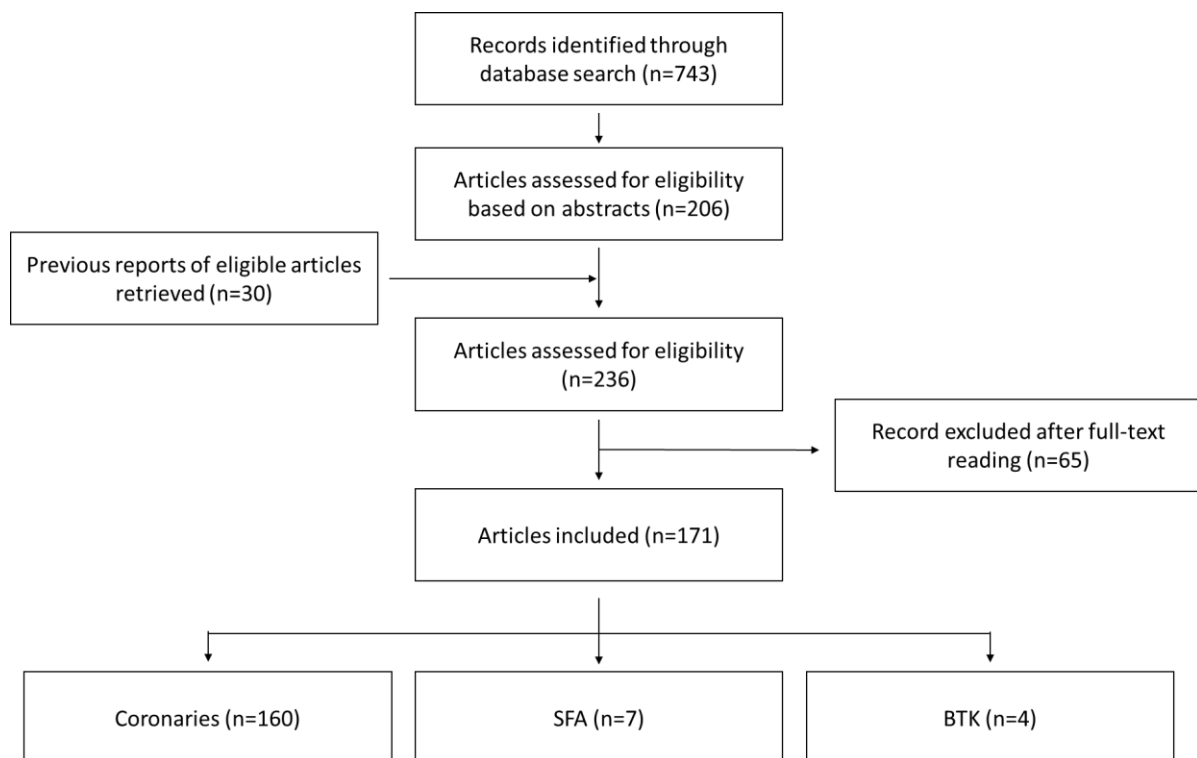


Figure 1.1: Diagramme de flux représentant la sélection et la répartition des articles

Les stents identifiés dans les articles retenus sont présentés Table 1.2. Tous, à l'exception des endoprothèses Zilver PTX® (Cook Medical) et Eluvia® (Boston Scientific) ont initialement été conçus pour le traitement des lésions coronariennes.

<b>Première Génération</b>		
<b>Stent</b>	Cypher	Taxus Element
<b>Compagnie</b>	Cordis	Boston
<b>Plateforme</b>	SS	SS
<b>Polymère</b>	DP (PEVA,PBMA)	DP (SIBS)
<b>Principe actif</b>	SES	PES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	140	132
<b>Nomenclature</b>	SS-DP-SES	SS-DP-PES

Table 1.2a : Stents actifs de première génération. PEVA : poly (éthylène-acétate de vinyle) ; PBMA : poly(méthacrylate de butyle) ; SIBS : Poly(Styrène-bloc-IsoButylène-bloc-Styrène)

Seconde Génération (Partie 1)							
<b>Stent</b>	Xience/Promus	Ultimaster	Nobori	Orsiro	BioMatrix	Promus element	EluNIR (BioNIR)
<b>Compagnie</b>	Abbot Vascular / Boston Scientific	Terumo	Terumo	Biotronik	Biosensors Europe SA	Boston	Medinol Ltd
<b>Plateforme</b>	CC	CC	SS	CC	SS	PC	CC
<b>Polymère</b>	DP (PBMA, PVDF-HFP)	BP (PDLLA-PCL)	BP (PDLLA)	BP (PLLA, silicon carbide)	BP (PLLA)	DP (fluoropolymer)	DP (PBMA)
<b>Principe actif</b>	EES	SES	BES	SES	BES	EES	RES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	81	80	112	60	120	81-86	87
<b>Nomenclature</b>	CC-DP-EES	CC-BP-SES	SS-BP-BES	CC-BP-SES	SS-BP-BES	PC-DP-EES	CC-DP-RES

Second Génération (Partie 2)							
<b>Stent</b>	Resolute	Resolute Onyx	Synergy	MiStent	Inspiron	Slender IDS	DESyne
<b>Compagnie</b>	Medtronic	Medtronic	Boston	Micell Technologies	Scitech	Svelte Medical	Elixir Medical Corp
<b>Plateforme</b>	CC	PICC	PC	CC	CC	CC	CC
<b>Polymère</b>	DP (PBMA, PHMA, PVP, PVA))	DP (PBMA, PHMA, PVP, PVA)	BP (PLGA)	BP (PLGA)	BP (PLLA) + PDLLGA)	BP (polyesteramide)	DP (PBMA)
<b>Principe actif</b>	ZES	ZES	EES	SES	SES	SES	NES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	91	81	74	64	75	81-84	80
<b>Nomenclature</b>	CC-DP-ZES	PICC-DP-ZES	PC-BP-EES	CC-BP-SES	CC-BP-SES	CC-BP-SES	CC-DP-NES

Seconde Génération (Partie 3)							
<b>Stent</b>	Firebird 2	Firehawk	Yukon Choice PC	Excel	BuMA	Partner	Supraflex
<b>Compagnie</b>	MicroPort	MicroPort	Translumina GmbH	JW Medical System Ltd	Sino Medical	Lepu Medical	Sahajanand Medical Technologies
<b>Plateforme</b>	CC	CC	SS	SS	SS	SS	CC
<b>Polymère</b>	DP (SBS)	BP (PLA)	BP (PDLLA)	BP (PLLA)	BP (PLGA, PBMA)	DP (PBMA/PEVA)	BP (PLLA, PLGA, PVP)
<b>Principe actif</b>	SES	SES	SES	SES	SES	SES	SES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	86	86	87	119	100	114	60
<b>Nomenclature</b>	CC-DP-SES	CC-BP-SES	SS-BP-SES	SS-BP-SES	SS-BP-SES	SS-DP-SES	CC-BP-SES

Seconde Génération (Partie 4)							
<b>Stent</b>	Cordimax	AES	Eluvia	Viabahn	ENdeavor	Tivoli	Stentys
<b>Compagnie</b>	Rientech Medical	Amsinomed Medical Company	Boston Scientific	Gore	Medtronic	Essen Technology	Stentys SA
<b>Plateforme</b>	SS	SS	Ni	Ni (+PTFE)	CC	CC	Ni
<b>Polymère</b>	BP (PLGA)	BP (PLLA)	DP (PBMA, PVDF-HFP)	DP (PEI)	DP (MPC, LMA,HPMA, 3-MPMA)	BP (PLGA)	DP
<b>Principe actif</b>	SES	Arsenic trioxide	PES	Heparin	ZES	SES	PES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>			218	N/A	91	80	102-133
<b>Nomenclature</b>	SS-BP-SES	SS-BP-AES	Ni-DP-PES	Ni-DP-Hep	CC-DP-ZES	CC-BP-SES	Ni-DP-PES

Table 1.2b: Description des stents actifs de seconde génération. HPMA = hydroxypropyl methacrylate; LMA = lauryl methacrylate; MPC = methacryloyloxyethyl phosphorylcholine; 3-MPMA = 3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate; PBMA: Poly(butyl methacrylate); PCL: polycaprolactone ; PEI: Polyethilenimine; PEVA = poly(ethylene-co-vinyl acetate); PLA/PLLA/PDLA/PDLLA/PLGA: Poly (lactid acid) family; PHMA = poly(hexyl methacrylate); PTFE: poly-tetrafluoroethylene; PVA = polyvinyl acetate; PVDF-HFP: polyvinylidene fluoride-hexafluoropropylene; PVP = polyvinylpyrrolidone; SIBS/SBS = poly(styrene-b-isobutylene-b-styrene)



Troisième Génération (Partie 1)						
<b>Stent</b>	ABSORB	Titan-2/ Titan Optimax	Biofreedom	Dual	Coroflex ISAR	VESTAsync
<b>Compagnie</b>	Abbott Vascular	Hexacath	Biosensors Europe SA	ISAR group	B-Braun	MIV Therapeutics
<b>Plateforme</b>	PLLA	CC	SS	SS	CC	CC
<b>Polymère</b>	-	Titanium nitride oxide surface	PF	PF	PF	PF, but nanoparticles of HA
<b>Principe actif</b>	EES		BES	SPES	SPES	SES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	157	90/75	112	87	55-65	65
<b>Nomenclature</b>	BVS-EES	BAS	SS-PF-BES	SS-PF-SPES		CC-PF-SES

Troisième Génération (Partie 2)					
<b>Stent</b>	Combo Dual	NeoVas	Nano+	Axxion stent	Zilver PTX
<b>Compagnie</b>	OrbusNeich Medical	Lepu Medical	Lepu Medical	Biosensors Europe SA	Cook Medica
<b>Plateforme</b>	SS	PLLA	SS	SS	Ni
<b>Polymère</b>	BP	-	PF	PF	PF
<b>Principe actif</b>	AntiCD34, SES	SES	SES	PES (+glycocalyx)	PES
<b>Epaisseur de maille (µm)</b>	90	170	91, Reservoir	117	
<b>Nomenclature</b>	SS-DP-AntiCD34-SES	BVS-SES	SS-PF-SES	SS-PF-PES	Ni-PF-PES

Table 1.2c: Description des stents de troisième génération. HA: hydroxyapatite; PLLA: famille des Poly (lactid acid).

### 2.2.1. *Au niveau coronaire*

#### Comparaison des différentes plateformes

La première génération de DES a été conçue en acier inoxydable (SS). Dans la deuxième génération, afin de conserver les propriétés mécaniques tout en réduisant l'épaisseur de la maille, le SS a progressivement été remplacé par du chrome-cobalt (CC) ou du platinium-cobalt (PC). Les études PLATINIUM (22–27) ont évalué des plateformes en PC (PROMUS Element<sup>®</sup>, Boston scientific) par rapport à un stent en CC (Xience V<sup>®</sup>, Abbott vascular/PROMUS<sup>®</sup>, Boston Scientific) ou en SS de la première génération (TAXUS Liberté<sup>®</sup>, Boston scientific) et démontré une non-infériorité entre PC, CC et SS (Table 1.3).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>PLATINIUM(22)</b>	2011	RT	Boston Scientific	De novo (1530)	PC-DP-EES(768):CC-DP-EES(762)	1:1	12	TLF		2.9%:3.4% of patients assigned to CoCr-EES versus PtCr-EES, respectively (difference: 0.5%, 95% confidence interval: -1.3% to 2.3%, p(noninferiority) = 0.001)	similar clinical outcomes
<b>PLATINIUM(23)</b>	2014	RT-post hoc	Boston Scientific	De novo lesions (1530)/ Japanese(63) vs non Japanese	Japanese cohort =PC-DP-EES(63):CC-DP-EES(61) /Non Japanese cohort PC-DP-EES(695):CC-DP-EES(688)	1:1	24	TLF		TLF in Japan (3.2%:5.0% , p=.68) and outside Japan (4.7%:5.9% respectively, p=.33; p for interaction = .82).	similar clinical outcomes
<b>PLATINIUM(24)</b>	2014	RT	Boston Scientific	De novo (1530)	PC-DP-EES(768):CC-DP-EES(762)	1:1	36	TLF		7.1%:5.9% (p=.40)	similar clinical outcomes
<b>PLATINIUM(25)</b>	2017	RT	Boston Scientific	De novo (1530)	PC-DP-EES(768):CC-DP-EES(762)	1:1	60	TLF		9.1%:9.3% (HR: 0.97, 95% CI: 0.69 to 1.37; (p=.87)	similar clinical outcomes
<b>PLATINIUM PLUS(26)</b>	2017	RT	Boston Scientific	All (2980)	PC-DP-EES(1952):CC-DP-EES(1028)	2:1	12	TVF		[4.6%] patients vs. 32 [3.2%], absolute difference 1.4%. 95% confidence interval [CI]: -0.1-2.9; upper limit of the one-sided 95% CI: 2.57%; non-inferiority p=0.012	similar clinical outcomes
<b>PERSEUS(28)</b>	2015	PA	Boston Scientific	All (1249)	CC-DP-PES(316):PC-DP-PES(933)		60	TLF		12.9%:12.1% (P=.66)	similar clinical outcomes
<b>PLATINIUM CHINA(27)</b>	2015	RT	Boston Scientific	De novo lesions (500)	SS-DP-PES(127):PC-DP-EES(373)	3:1	12		CV death	1.6%:0% (p=.06)	similar clinical outcomes

Table 1.3: Essais randomisés comparant les plateformes en platini-cobalt (PC) aux autres plateformes métalliques. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; CV death: Cardio-vascular death; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure.

Dans les anatomies tortueuses et mobiles, le NiTiNOL a démontré une plus grande résistance à la fracture que les stents expansibles par ballonnet grâce à ses propriétés de mémoire de forme et est couramment utilisé dans le territoire fémoral superficiel. Un seul stent en NiTiNOL a été évalué dans un essai randomisé pour les coronaires (Stentys, Stentys SA, France) (29), mais le critère de jugement principal de cet essai était morphologique (pourcentage de mailles malapposées en tomographie par cohérence optique(OCT)). À 9 mois, ce stent n'était pas inférieur à un stent à élution de zotarolimus expansible par ballonnet, chez les patients présentant un infarctus du myocarde avec élévation du segment ST.

Les stents bioactifs sont principalement représentés par des plateformes en CC recouverts de particules de titane-nitride-oxyde (Ti-No) par un traitement plasma. Grâce à ce procédé, de l'azote est exprimé sur la surface du stent afin d'éviter la RIS. Ils ont démontré leur non-infériorité au gold-standard de la deuxième génération (CC-DP-EES) (30,31) ou au CC-DP-ZES(32,33) dans plusieurs études chez des patients tout venant (Table 1.4), dans le sous-groupe des diabétiques où le taux de MACE était inférieur avec un stent CC-DP-EES (14,5% contre 4,4% respectivement ( $p=.02$ )) (34).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
TIDE(32)	2011	RT	-	All (302)	BAS(152):CC-DP-ZES(150)	1:1	12	-	MACE	21.1%:18.0%, HR= 1.19, IC 95% 0.71-2.00 (p=.5)	similar clinical outcomes
TIDE(33)	2015	RT	-	All (302)	BAS(152):CC-DP-ZES(150)	1:1	60	-	MACE	27.6%:25.3%, RR=1.13, IC95% 0.72-1.75 (p=.06)	similar clinical outcomes
TITANIC XV(34)	2014	RT	-	Diabetics (173)	BAS(83):CC-DP-EES(90)	1:1	12	MACE	-	14.5%:4.4% (p=.02)	in favor of CC-DP-EES
TITAX AMI BASE ACS(35)	2014	PA (TITAX-AMI, BASE-ACS)	-	ACS (501)	BAS(245):SS-DP-PES(97):CC-DP-EES(159)	1:2	24	MACE	-	RR:0.85, IC95% 0.53-1.35,p=.49	similar clinical outcomes
BASE ACS(31)	2016	RT	Hexacath	ACS (753)	BAS(382):CC-DP-EES(371)	1:1	48	MACE	-	14.7% : 17.8% (p=0.24)	similar clinical outcomes
BASE ACS(30)	2016	RT	Hexacath	ACS (827)	BAS(417):CC-DP-EES(410)	1:1	60	MACE	-	14.4% : 17.8% (p=0.26)	similar clinical outcomes

Table 1.4: Essais randomisés comparant les stents bio-actifs (BAS) aux stents actifs de seconde génération. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event.

Les scaffolds (échafaudages) vasculaires résorbables (BVS) sont représentés par des plateformes polymériques (acide polylactique, PLA) ou métalliques (alliage de magnésium) destinées à remplacer les structures métalliques précédemment utilisées par des structures totalement résorbables. Ils peuvent être chargés de médicaments qui, en théorie, seraient libérés tout au long de leur résorption. Les essais randomisés évaluant des BVS sont présentés Table 1.5. Les études ABSORB, AIDA et TROFI II(36–38,38–44) ont été conçues pour comparer un BVS éluant l'évérolimus (ABSORB®, Abbott Vascular) à un stent similaire en chrome-cobalt libérant de l'évérolimus via un polymère non-résorbable (Xience®, Abbott Vascular). Bien que les résultats initiaux aient été similaires dans les études visant à analyser des paramètres cliniques tels que le TLF, le BVS-EES s'est révélé inférieur au stent métallique dans plusieurs essais(40,42,43,45,46)après deux ans. Un essai(47) a évalué un autre BVS éluant du sirolimus (NeoVas®, Lepu Medical) par rapport au CC-DP-EES. Après un an, le taux de récurrence d'angine de poitrine était similaire entre les deux dispositifs, mais ces résultats doivent être interprétés avec prudence car les effectifs de l'étude étaient définis pour un critère de jugement primaire angiographique (thrombose du segment cible).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>ABSORB CHINA(36)</b>	2015	RT	Abbott vascular	all-comers (480)	BVS(241):CC-DP- EES(239)	1:1	12		TLF	3.4% : 4.2% (p = 0.62)	similar clinical outcomes
<b>ABSORB II(37)</b>	2015	RT	Abbott vascular	all-comers (501)	BVS(335):CC-DP- EES(166)	2:1	12		POCE	5% : 3%	similar clinical outcomes
<b>ABSORB II(38)</b>	2016	RT	Abbott vascular	all-comers (501)	BVS(320):CC-DP- EES(160)	2:1	24		POCE	11.6% : 12.8% (p=0.70)	similar clinical outcomes
<b>ABSORB II(45)</b>	2016	RT	Abbott vascular	all-comers (501)	BVS(308):CC-DP- EES(152)	2:1	36		POCE	68/325 (21%) : 39/161 (24%) (p=0.41)	In favor of CC-DP- EES
<b>ABSORB II(46)</b>	2018	RT	Abbott vascular	all-comers (501)	BVS(289):CC-DP- EES(139)	2:1	48		POCE	23.6% : 26.7% (p=0.47)	In favor of CC-DP- EES
<b>ABSORB III(39)</b>	2015	RT	Abbott vascular	all-comers (2008)	BVS(1322):CC-DP- EES(686)	2:1	12	TLF		7.8% : 6.1% (p=0.007)	similar clinical outcomes
<b>ABSORB III(40)</b>	2017	RT	Abbott vascular	all-comers (2008)	BVS(1322):CC-DP- EES(686)	2:1	36	TLF		13.4% : 10.4% (p = 0.06)	In favor of CC-DP- EES
<b>ABSORB JAPAN(41)</b>	2015	RT	Abbott vascular	all-comers (400)	BVS(266):CC-DP- EES(134)	2:1	12	TLF		4.2% : 3.8% (Phon-inferiority < 0.0001)	similar clinical outcomes

Table 1.5 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>ABSORB JAPAN(42)</b>	2016	RT	Abbott vascular	all-comers (400)	BVS(266):CC-DP- EES(134)	2:1	24	TLF		7.3% : 3.8% (p=0.18),	In favor of CC-DP- EES
<b>de Ribamar Costa J(48)</b>	2016	PA(ABSORB EXTEND, SPIRIT trials and XIENCE USA trial)	Abbott vascular	all-comers (1624)	BVS(812):CC-DP- EES(812)		12	MACE		5.0% : 4.8% (p=0.83)	similar clinical outcomes
<b>AIDA(43)</b>	2017	RT	Abbott vascular	all-comers (1845)	BVS(924):CC-DP- EES(921)	1:1	24	TVF		11.7% : 10.7% (p=0.43)	In favor of CC-DP- EES
<b>EVERBIO II(49)</b>	2017	RT	Abbott Vascular, Biosensor Int, Boston Scientific	All (238)	BVS-EES(78):PC-DP- EES(80):SS-BP-BES(80)	1:1:1	24		DOCE	21%:16%:9% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>Campos CM(50)</b>	2018	PA(ABSORB EXTEND, SPIRIT trials and XIENCE USA trial)	Abbott vascular	Diabetics (1097)	BVS(215):CC-DP- EES(882)		24	MACE		6.5% : 8.9% (p=0.40)	similar clinical outcomes
<b>NEOVAS(47)</b>	2018	RT		All (560)	BVS-EES(278):CC-DP- EES(282)	1:1	12		Recurrent angina	27.9%:32.1%; (p=.26)	similar clinical outcomes
<b>TROFI II</b>	2018	RT	Abbott Vascular, Terumo	ACS (191)	BVS-EES(95):CC-DP- EES(96)	0,04236	36		DOCE	5.3%:3.1% (p=0.47)	similar clinical outcomes

Table 1.5: Essais randomisés comparant les stents résorbables (BVS) aux stents de seconde génération. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; ID/CI-TLR/TVR: Ischemia-driven/Clinically indicated Target Lesion/Vessel Revascularization; DOCE: Device-oriented composite endpoint; POCE: Patient-oriented composite endpoint.



## Polymères

Contrairement à la première génération de DES, la seconde utilise des polymères biocompatibles, non-résorbables (durable polymer, DP) ou résorbables (bioabsorbable polymer, BP) (Table 1.6). Les essais ISAR TEST IV, I LOVE IT 2 et EVOLVE(51–56) ont été spécifiquement conçus pour étudier l'impact des polymères résorbables par rapport aux polymères non-résorbables et ont démontré la non-infériorité de BP versus DP. Dans ISAR TEST IV(52), une étude randomisée à trois bras comparant SS-BP-SES (n=1299) à CC-DP-EES (n=652) et SS-DP-SES (n=652), SS-BP-SES était non inférieur à CC-DP-EES à 60 mois, mais SS-DP-SES avait un taux de DOCE supérieur, suggérant une supériorité des BP. L'essai I LOVE IT 2(53,54) a comparé un CC-BP-SES (Tivoli®, Essen Technology), basé sur du PLLA, à un CC-DP-SES (Firebird®, Microport) avec un polymère de poly(styrène-butadiène-styrène) (SBS) utilisé dans la première génération. Après 1 et 3 ans, les deux stents démontraient des résultats similaires sur le critère primaire (TLF). EVOLVE II(55) comparait deux prothèses à libération d'évérolimus, l'une avec un DP (PBMA, poly(méthacrylate d'hexyle et PVDF-HFP, polyfluorure de vinylidène-hexafluoropropylène, Xience®, Abbott vascular ou Promus®, Boston Scientific) et l'autre avec un BP (PLGA, poly(acide lactico-glycolic), Synergy®, Boston Scientific). Après un an, des résultats similaires étaient observés dans les deux groupes sur les taux de TLF.

L'essai BIOSCIENCE a suggéré un avantage initial du CC-BP-SES par rapport au CC-DP-EES sur le TLF chez les patients présentant un STEMI (Infarctus du myocarde avec élévation du segment ST) à 12 mois(57), mais cet avantage n'était pas maintenu dans le temps et n'était pas non plus observé dans la population générale(58–60) ou dans le sous-groupe des patients diabétiques(61). Lansky AJ et al.(62) ont effectué une méta-analyse des essais DESSOLVE I/II et ISAR TEST IV. Après appariement par un score de propension, il restait 102 patients dans chaque groupe (CC-BP-SES versus CC-DP-EES). Les deux stents se sont révélés équivalents sur

le TLF après 36 mois, mais le taux de CI-TLR semblait plus faible avec un BP. Enfin, l'essai BIOFLOW V(63) a comparé un CC-BP-SES (Orsiro®, Biotronik) au Xience® (Abbott vasculaire, CC-DP-EES). Il est intéressant de noter que le taux de TLF passait de 10 à 6 % avec le stent utilisant BP à un an (IC95%[-6-84 à -0-29], p=0-0399).

En revanche, l'étude SORT OUT VI(64,65) et une méta-analyse(66), comparant respectivement le SS-BP-BES au CC-DP-ZES et au CC-DP-EES, ont montré une amélioration des résultats précoces avec un DP. Cependant, les principes actifs étaient également différents ce qui limite l'interprétation des résultats. El-Hayek et al. (67) ont effectué une méta-analyse de 16 essais randomisés, incluant plus de 19 000 patients, comparant des BP à des stents avec DP biocompatibles de deuxième génération, avec des analyses de sous-groupe pour comparer le type de plateforme ou de médicament libéré. Ils n'ont observé aucune différence significative sur les taux de TVR, d'infarctus du myocarde ou de décès au terme d'un suivi moyen de 26 mois et ont conclu à une innocuité et une efficacité similaire entre BP et DP, indépendamment du type de plateforme ou de principe actif.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
ISAR TEST 4(51)	2009	RT	-	All (2603)	SS-BP-SES(1299);[CC-DP-EES(652);SS-DP-SES(652)]	2:[1:1]	12	DOCE		13.8%:14.4% (p non-inferiority=0.005)	similar clinical outcomes, BP non inferior to DP
ISAR TEST 4(52)	2016	RT	-	All (2603)	SS-BP-SES(1299);CC-DP-EES(652) and CC-DP-EES(652);SS-DP-SES(652)	2:1:1	60		DOCE	20.5%:19.5%(HR=1.04 IC95%=0.84-1.29 (p=0.71)) and 19.5%:23.5% (HR=1.21, IC95=0.95-1.53 (p=0.12))	similar clinical outcomes between SS-BP-SES and CC-DP-EES, but higher rate of DOCE with SS-DP-SES than CC-DP-EES
LEADERS(68)	2011	RT	Biosensors Europe SA	All (1707)	SS-BP-BES(857);SS-DP-SES(850)	1:1	48	MACE		18.7%:22.6% (RR=0.81, IC95%=0.66-1.00, p for non-inferiority <0.0001)	similar clinical outcomes
LEADERS(69)	2015	RT post-hoc analysis	Biosensors Europe SA	ACS (573)	SS-BP-BES(280);SS-DP-SES(293)		60	MACE		18.2%:25.9% (RR=0.67, IC95%=0.47-0.95, p=0.025)	In favour of BP-BES versus DP-SES
LEADERS(70)	2016	RT post-hoc analysis	Biosensors Europe SA	Bifurcation lesions (497)	SS-BP-BES(258);SS-DP-SES(239)	1:1	60	MACE		24%:29.3% (p0.20)	similar clinical outcomes on primary outcome, but in favor of BES in CI-TLR (10.1% vs. 15.9%, P = 0.0495), and CI TVR (12.0% vs. 19.2%, P = 0.023)
LEADERS(71)	2016	RT post-hoc analysis	Biosensors Europe SA	CTO patients (81)	SS-BP-BES(45);SS-DP-SES(36)		60	MACE		22.2%:38.9% (p = 0.147)	similar clinical outcomes on primary outcome, but in favor of BES in CI-TLR (11.1%:33.3% (p=0.0214))
COMPARE II(72)	2013	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP-BES(1795);CC-DP-EES(912)	2:1	12	MACE		5.2%:4.8% (RR=1.07 IC95% 0.75-1.52; p non-inferiority<0.0001)	similar clinical outcomes

Table 1.6 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>COMPARE II(73)</b>	2015	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP-BES(1795):CC-DP- EES(912)	2:1	36	MACE		11.9%:11.1 % (p=0.57)	similar clinical outcomes
<b>LIPSIA Yukon(74)</b>	2014	RT	Translumina GmbH	Diabetics (236)	SS-BP-SES(120):SS-DP- PES(116)	1:1	60		MACE	29.7%:31.6% (p=0.86, OR=0.91 IC95%=0.52-1.60)	similar clinical outcomes
<b>NEXT(75)</b>	2013	RT		All (3235)	SS-BP-BES(1617):CC-DP- EES(1618)	1:1	12		CI-TLR	3%:3% p=NS	similar clinical outcomes
<b>NEXT(76)</b>	2014	RT		All (3235)	SS-BP-BES(1617):CC-DP- EES(1618)	1:1	24	CV death		7.8%:7.7%; difference of 0.14% [upper 99.4% CI, 2.5%]; noninferiority P = .003	similar clinical outcomes
<b>NEXT(77)</b>	2015	RT		All (3235)	SS-BP-BES(1617):CC-DP- EES(1618)	1:1	36		CV death	9.9%:10.3% P noninferiority<0.0001 P superiority=NS	similar clinical outcomes
<b>SORT OUT V(78)</b>	2013	RT	Terumo and Cordis, Johnson & Johnson.	All (2468)	SS-BP-BES (1229):SS-DP- SES(1239)	1:1	12	MACE		p=.06	similar clinical outcomes
<b>SORT OUT V(79)</b>	2017	RT	Terumo and Cordis, Johnson & Johnson.	All (2468)	SS-BP-BES (1229):SS-DP- SES(1239)	1:1	60	MACE		14.8%:15.8%, OR=0.93, IC95% 0.75-1.16 (p=.53)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE(58)</b>	2014	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP-SES(1063):CC-DP- EES(1056)	1:1	12	TLF		6.5%:6.6% (p for non-inferiority <0.0004)	similar clinical outcomes

Table 1.6 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>BIOSCIENCE(61)</b>	2015	RT	Biotronik	Diabetics (486)	CC-BP-SES(257):CC-DP-EES(229)	1:1	12	TLF		10.9%:9.3% (HR=1.19; IC95% 0.67-2.10; p=0.56)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE(57)</b>	2016	RT	Biotronik	ACS (407)	CC-BP-SES(211):CC-DP-EES(196)	1:1	12	TLF		3.4%:8.8% (RR=0.38, IC95% 0.16-0.91, p=0.024)	In favor of CC-BP-SES in ACS patients
<b>BIOSCIENCE(59)</b>	2016	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP-SES(1063):CC-DP-EES(1056)	1:1	24	TLF		10.5%:10.4% (RR=1.00, IC95% 0.77-1.31, p=0.979)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE(60)</b>	2018	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP-SES(1063):CC-DP-EES(1056)	1:1	60	TLF		20.2%:18.8% (RR=1.07 IC95% 0.88-1.31; p=0.487)	similar clinical outcomes
<b>I LOVE IT 2(53)</b>	2014	RT	Essen Technology	All (2737)	CC-BP-SES(1829):CC-DP-SES(908)	2:1	12	TLF		6.3%:6.1% (p=0.80, p for noninferiority =0.0002)	similar clinical outcomes
<b>I LOVE IT 2(54)</b>	2018	RT	Essen Technology	All (2737)	CC-BP-SES(1784):CC-DP-SES(879)	2:1	36	TLF		8.9%:8.6% (p=0.84)	similar clinical outcomes
<b>BASKET PROVE II(80)</b>	2015	RT		All (2291)	SS-BP-BES(765):CC-DP-EES(765):CC(761)	1:1:1	24	MACE		7.6% : 6.8% : 12.7%	similar clinical outcomes between DES, but superiority of SS-BP-BES to BMS
<b>SORT OUT VI(64)</b>	2015	RT	Biosensors International, Medtronic Cardiovascular	All (2999)	CC-DP-ZES(1502):SS-BP-BES(1497)	1:1	12	TLF		5.3%:5.0%, RAR = 0.0025 (p=.004)	in favor of CC-DP-ZES

Table 1.6 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>SORT OUT VI(65)</b>	2017	RT	Biosensors International, Medtronic Cardiovascular	All (2999)	CC-DP-ZES(1502):SS-BP-BES(1497)	1:1	36	MACE		8.6%:9.6% (p=.36)	similar clinical outcomes
<b>LONG DES V(81)</b>	2014	RT	Terumo	De Novo Native Long Coronary Artery Lesions (500)	SS-BP-BES(245):PC-DP-EES(255)	1:1	12		MACE	16.7% :16.5% (P=.94)	similar clinical outcomes
<b>RESOLVE(82)</b>	2014	RT	-	ACS (1192)	SS-BP-SES(596):CC-DP-SES(596)	1:1	12	MACE		12.4%:13.3%, p=.67	similar clinical outcomes
<b>BIOFLOW II(83)</b>	2015	RT	Biotronik	All (452)	CC-BP-SES(298):CC-DP-EES(154)	2:1	12		TLF	6.5% : 8.0% (HR=0.82; IC95% [0.40-1.68], p=0.58)	similar clinical outcomes
<b>CTO IVUS(84)</b>	2015	RT	-	All (402)	CC-DP-ZES(201):SS-BP-BES(201)	1:1	12		MACE	4.0%:5.7% (p=0.45)	similar clinical outcomes
<b>EVOLVE II(55)</b>	2015	RT	Boston Scientific	All (1684)	PC-BP-EES(846):PC-DP-EES(838)	1:1	12	TLF		6.7%:6.5% (p=0.0005 for noninferiority)	similar clinical outcomes
<b>NOBORI I(85)</b>	2015	RT	Terumo	All (363)	SS-BP-BES(238):SS-DP-PES(125)	2:1	60		CV death	10.9%:11.2%	similar clinical outcomes
<b>BIO RESORT(86)</b>	2016	RT	Biotronik, Boston Scientific, Medtronic.	All (3514)	PC-BP-EES(1172):CC-DP-ZES(1173):CC-BP-SES(1169)	1:1:1	12	TVF		5%:5%:5% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>CENTURY II(87)</b>	2016	RT	Terumo	All (525)	CC-BP-SES(277):CC-DP-EES(248)	1:1	12	TLF		6.9%:7.7% (p=0.72)	similar clinical outcomes

Table 1.6 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>CENTURY II(88)</b>	2016	RT	Terumo	ACS (264)	CC-BP-SES(126);CC-DP-EES(138)	1:1	24	TLF		6.3%:6.5% (p = 0.95)	similar clinical outcomes
<b>DIRECT II(89)</b>	2016	RT	Svelte Medical Systems	All (159)	CC-BP-SES(108);CC-DP-ZES(51)	2:1	12		TVF	6.5%:9.8% (p=0.524)	similar clinical outcomes
<b>Wijns W(90)</b>	2016	PA (data from DISSOLVE II)	Micell Technologies	All (184)	CC-BP-SES(123);CC-DP-ZES(61)	2:1	24		MACE	6.7%:13.3% (p=0.167)	similar clinical outcomes
<b>Lansky AJ(62)</b>	2016	PA (DESSOLVE I/II, ISAR TEST 4)	Micell Technologies	All (204, propensity matched)	CC-BP-SES(102);CC-DP-EES(102)		36	TLF		5.0%:12.5% (p=0.07)	similar TLF, but reduced CI-TLR with CC-BP-SES
<b>PANDA III(91)</b>	2016	RT		All (2348)	SS-BP(PLA)-SES(1174);SS-BP(PGLA + poly (n-butyl methacrylate )-SES(1174) (BuMA versus Excel)	1:1	12	TLF		TLF=6.4 % in both (p non inferiority=.0003)	similar clinical outcomes
<b>PANDA III(92)</b>	2016	RT-post hoc		ACS (732)	SS-BP(PLA)-SES(366);SS-BP(PGLA + poly (n-butyl methacrylate )-SES(366) (BuMA versus Excel)	1:1	12	TLF		5.5%:8.3%, P=.14	similar clinical outcomes
<b>BIOFLOW V(63)</b>	2017	RT	Biotronik	All (1334)	CC-BP-SES(884);CC-DP-EES(450)	2:1	12	TLF		6%:10% (IC95% [-6.84 to -0.29], p=0.0399)	In favor of CC-BP-SES
<b>COMPARE II(93)</b>	2017	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP-BES(1795);CC-DP-EES(912)	2:1	60	MACE		17.3%:15.6% (p=0.26)	similar clinical outcomes
<b>EVERBIO II(49)</b>	2017	RT	Abbott Vascular, Biosensor Int, Boston Scientific	All (238)	BVS-EES(78);PC-DP-EES(80);SS-BP-BES(80)	1:1:1	24		DOCE	21%:16%:9% (p=NS)	similar clinical outcomes

Table 1.6 - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>EVOLVE China(56)</b>	2017	RT	Boston Scientific	All (412)	PC-BP-EES(205);PC-DP-EES(207)	1:1	12		MACE	5.5%:6.3% (p=0.73)	similar clinical outcomes
<b>ORIENT(94)</b>	2017	RT	BIOTRONIK Korea	All (372)	CC-BP-SES(250);CC-DP-ZES(122)	2:1	12		TLF	2.4%:3.3% (p=.621)	similar clinical outcomes
<b>Vlachoianis(66)</b>	2017	PA (NEXT et COMPARE II)	Terumo Europe	All (5942)	SS-BP-BES(3412);CC-DP-EES(2530)		36		CV death	7.8%:6.7%, p=0.07 // unadjusted (BP-BES 5.6% vs. 4.5%, p=0.02) and adjusted (HR 1.36; 1.01-1.82, p=0.04) TV-MI rates were higher in the BP-BES group than in the DP- EES group.	in favor of CC-DP- EES
<b>DESSOLVE III(95)</b>	2018	RT	Micell Technologies	All(1398)	CC-BP-SES(703);CC-DP-EES(695)	1:1	12	DOCE		5.8%:6.5% (pnon-inferiority=0.0001)	similar clinical outcomes

Table 1.6: Essais randomisés et méta-analyses comparant polymers résorbables et non-résorbables. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; CV death: Cardio-vascular death; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; ID/CI-TLR/TVR: Ischemia-driven/Clinically indicated Target Lesion/Vessel Revascularization; DOCE: Device-oriented composite endpoint.



Certaines plates-formes sont dites « polymer-free » (PF), c'est-à-dire qu'elles n'utilisent pas de polymères pour immobiliser et contrôler la libération d'un principe actif (Table 1.7). Ceci est possible soit via l'utilisation de principes actifs très lipophiles comme le paclitaxel, soit via sur une stratégie de " réservoirs ", qui consiste à créer sur la surface métallique des nano- ou micro-cavités pouvant être remplies de substances thérapeutiques. Une étude(96) comparait spécifiquement deux stents en SS libérant du sirolimus avec un polymère non-résorbable ou sans polymère, et concluait à des résultats similaires sur le MACE après deux ans, mais cette étude était initialement conçue pour évaluer la TAT à 9 mois. L'essai ISAR TEST 5(97) représente probablement le plus haut niveau actuel de preuve sur les DES « polymer-free ». Cette étude a comparé un stent de deuxième génération (CC-DP-ZES, Resolute®, Medtronic Cardiovascular) à une plateforme en SS sans polymère délivrant à la fois du sirolimus et du probucol (SS-PF-SPES). À 60 mois, le taux de DOCE était semblable dans les deux groupes dans la population globale(98), mais aussi chez les diabétiques(99) et chez les patients en syndrome coronarien aigu(100).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
ISAR TEST 5(97)	2011	RT	-	All (3002)	SS-PF-SPES(2002)-CC- DP-ZES(1000)	2:1	12	DOCE		13.1%:13.5% (p noninferiority=0.006)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(98)	2016	RT	-	All (3002)	SS-PF-SPES(2002)-CC- DP-ZES(1000)	2:1	60	DOCE		23.8%:24.2% (HR=0.98 IC95%=0.84-1.15 p=0.80)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(99)	2016	RT post- hoc	-	Diabetics (870)	SS-PF-SPES(575)-CC- DP-ZES(295)		60	DOCE		32.9%:33.4% (HR=0.98, IC95%=0.76-1.26, p=0.88)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(100)	2017	RT post- hoc	-	ACS (311)	SS-PF-SPES(215)-CC- DP-ZES(96)		60	DOCE		18.3%:20.1% (HR=0.87, IC95%=0.50-1.51 p = 0.62)	similar clinical outcomes
NANO(96)	2014	RT	Lepu Medical Technology	All (291)	SS-PF-SES(143):SS-DP- SES(148)	1:1	24		MACE	7.6%:5.9% (P=.75)	similar clinical outcomes
BIOFREEDOM FIM(101)	2016	RT	Biosensors Europe SA	All (182)	SS-PF-BES(60):SS-PF- BES Low dose(62):SS- DP-PES(60)	1:1:1	60		MACE	23.8% : 26.4% : 20.3% (p=NS)	similar clinical outcomes of SS- PF-BES and SS- DP-PES, inferiority of SS-PF-BES Low dose

Table 1.7: Essais randomisés comparant les stents actifs "polymer-free" aux stents actifs avec polymères résorbables ou non-résorbables. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; DOCE: Device-oriented composite endpoint.

### Principes Actifs

La première génération de DES libérait du paclitaxel (paclitaxel-eluting stent, PES) et du sirolimus (sirolimus-eluting stent, SES) (Table 1.8). Les premiers résultats de l'étude SIRTAX (102) et de l'étude JDESSERT(103) suggéraient un taux plus faible de MACE avec le SES qu'avec le PES, respectivement chez des patients non sélectionnés et chez des diabétiques. Cependant, les essais SIRTAX et SORT OUT II(104,105) ont tous deux publié des résultats cliniques sur le taux de MACE à 10 ans, sans différence statistique entre les deux stents.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
SIRTAX(102)	2005	RT	none	All (1012)	SS-DP- SES(503);SS- DP-PES(509)	1:1	12	MACE		6.2%:10.8%,HR=0.56, IC95% 0.36-0.86 (p=.009)	in favor of CC:DP:SES
SIRTAX(104)	2016	RT-post hoc	none	All (895)	SS-DP- SES(448);SS- DP-PES(447)	1:1	120	MACE		33.7%:33.8% (p=.72)	similar clinical outcomes
SORT OUT II(106)	2008	RT	Boston Scientific and Cordis	All (2098)	SS-DP- SES(1065);SS- DP-PES(1033)	1:1	12	MACE		9.3%:11.2%, HR=0.83 IC95% 0.63-1.08 (p=.16)	similar clinical outcomes
SORT OUT II(107)	2014	RT	Boston Scientific and Cordis	All (2098)	SS-DP- SES(1065);SS- DP-PES(1033)	1:1	60	MACE		22.3%:20.8%, (p=NS)	similar clinical outcomes
SORT OUT II(105)	2017	RT	Boston Scientific and Cordis	All (2098)	SS-DP- SES(1065);SS- DP-PES(1033)	1:1	120	MACE		32.5%:33.1%, p=.60	similar clinical outcomes
ISAR-LEFT MAIN(108)	2009	RT	-	unprotected left main coronary (607)	SS-DP- PES(302);SS- DP-SES(305)	1:1	12	MACE		13.6%:15.8% (RR=0.85, IC95%=0.56-1.29, p = 0.44)	similar clinical outcomes
LIPSIA Yukon(74)	2013	RT	Translumina GmbH	Diabetics (236)	SS-BP- SES(120);SS- DP-PES(116)	1:1	60		MACE	29.7%:31.6% (p=0.86, OR=0.91 IC95%=0.52-1.60)	similar clinical outcomes
ISAR DESIRE 2(109)	2014	RT	-	In-SES-restenosis (450)	SS-DP- SES(225);SS- DP-PES(225)	1:1	12		MACE	With DM 19.8%:21.1% (p = 0.84) without DM 19.4%:16.8% (p = 0.84)	similar clinical outcomes
J- DESSERT(103)	2014	RT	-	All (3486), stratified on diabetic status	SS-DP- SES(1664);SS- DP-PES(1684)	1:1	12		TVF	5.7%:8.6% (HR=0.66 IC95%=0.51-0.86, p<0.01)	In favor of SES over PES
J- DESSERT(110)	2014	RT post- hoc analysis	-	Patients with moderate renal insufficiency (1206)	SS-DP- SES(613);SS- DP-PES(593)		12		TVF	5.7% and 8.1% (p = 0.10)	similar clinical outcomes
J- DESSERT(111)	2016	RT	-	Diabetics (1705)	SS-DP- SES(846);SS- DP-PES(859)	1:1	36		MACCE	9.4%:12.2% (HR=0.77, IC95%=0.57-1.03, p=0.08)	similar clinical outcomes

Table 1.8: Essais randomisés évaluant les stents actifs au paclitaxel et au sirolimus (PES versus SES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; MACE: Major adverse cardiac event; MACCE: Major adverse cardiac & cerebrovascular event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; DM: Diabetes mellitus.

La seconde génération de DES est marquée par l'utilisation d'évérolimus (XIENCE®, Abbott vascular/PROMUS®, Boston Scientific, via un polymère non résorbable à base de PBMA et de PVDF-HFP). Les essais comparant les stents à élution d'évérolimus aux stents à base de paclitaxel ou de sirolimus de la première génération sont repris dans les tables 1.9a et 9b, respectivement. Dans l'étude TUXEDO-INDIA(112–114), un CC-DP-EES était comparé à un CC-DP-PES chez les patients diabétiques. À un an, le taux de TVF était plus faible avec EES qu'avec PES, avec des résultats maintenus à deux ans. L'étude COMPARE(115,116) (CC-DP-EES versus SS-DP-PES) a démontré un taux plus faible de MACE avec EES à 12 mois (6% versus 9% (RR=0.69 IC95% 0.50-0.95, p=0.02)), avec une différence significative maintenue après 60 mois (18,4%:25,1% (p<0.001)).

Dans les essais SORT OUT IV/DIABEDES, XAMI et RACES-MI(117–121), le CC-DP-EES a été comparé à des plateformes et polymères similaires délivrant du SES. L'essai SORT OUT IV(122,123) a montré un taux plus faible de MACE à 18 et 60 mois avec EES dans la population en générale. Les résultats étaient également améliorés dans le sous-groupe des syndromes coronariens aigus, comme l'ont démontré les essais XAMI et RACES-AMI(118–121). Cependant, l'étude DIABEDES(117) (analyse post-hoc planifiée de l'étude SORT OUT IV sur le sous-groupe de patients diabétiques) a montré des taux similaires de MACE à 4 ans, avec une tendance à l'amélioration des résultats avec EES (20,4% pour le EES contre 23,8% pour SES (HR 0,84, IC95% 0.47-1,49 ; p = 0.55)). Un seul stent (Orsiro® ; Biotronik) qui délivre du sirolimus a donné de meilleurs résultats que les stents à l'EES dans plusieurs études(57,62,63). Cependant, ce stent libère du sirolimus via un polymère biorésorbable (PLLA), ce qui pourrait expliquer au moins partiellement ce résultat.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>COMPARE(115)</b>	2010	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (1800)	CC-DP- EES(897);SS- DP-PES(903)	1:1	12	MACE		6%:9% (RR=0.69 IC95% 0.50-0.95, p=0.02).	In favor of EES rather than PES
<b>COMPARE(116)</b>	2015	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (1800)	CC-DP- EES(897);SS- DP-PES(903)	1:1	60	MACE		18.4%:25.1% (p<0.001)	In favor of EES rather than PES
<b>TUXEDO- INDIA(112)</b>	2015	RT	Boston Scientific	Diabetics (1830)	CC-DP- EES(916);SS- DP-PES(914)	1:1	12	TVF		5.6%:2.9%,(p=.005)	in favor of CC- DP-EES
<b>TUXEDO- INDIA(113)</b>	2016	RT-post hoc	Boston Scientific	Diabetics (1830)	CC-DP- EES(916);SS- DP-PES(914)	1:1	12	TVF		ITDM=3.4%:7.9%,p=.007 /non ITDM (p=NS)	in favor of CC- DP-EES (ITDM subgroup)
<b>TUXEDO- INDIA(114)</b>	2017	RT	Boston Scientific	Diabetics (1830)	CC-DP- EES(916);SS- DP-PES(914)	1:1	24	TVF		4.3%:6.6%, (p=.03)	in favor of CC- DP-EES
<b>Cassese S(124)</b>	2016	PA (ISAR- LEFT MAIN, ISAR-LEFT MAIN 2)	-	unprotected left main coronary (1257)	[CC-DP- ZES(324);CC- DP- EES(326)];[SS- DP-PES(302)- SS-DP- SES(305)]	-	36	MACCE		28.2%:27.5 % (HR 1.03, IC95%=0.83-1.26; p = 0.86)	similar clinical outcomes

Table 1.9a: Essais randomisés comparant les stents à l'évérolimus (EES) aux stents de 1ère génération libérant du paclitaxel (PES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; MACE: Major adverse cardiac event; MACCE: Major adverse cardiac & cerebrovascular event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>BASKET PROVE(125)</b>	2010	RT	-	All (2314)	SS-DP-SES(775):CC-DP- EES(774):CC(765)	1:1:1	24	CV death		2.6% : 3.2% : 4.8% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>BASKET PROVE(126)</b>	2014	RT - Planned post-hoc analysis	-	ACS without ST- segment elevation (754)	SS-DP-SES(244):CC-DP- EES(264):CC(246)	1:1:1	24	CV death		SS-DP-SES>BMS (HR: 0.31 [CI: 0.11- 0.90], p=0.03), CC- DP-EES>BMS (HR: 0.74 [CI: 0.44-1.24], p=0.25)	In favor of DES
<b>RESET(127)</b>	2012	RT	Abbott vascular	All(3197)	CC-DP:EES(n=1597):SS-DP:SES(n=1600)	1:1	12		CI-TLR	3%:3.9% (p=2)	similar clinical outcomes
<b>RESET(128)</b>	2014	RT-post hoc	Abbott vascular	All(3196)	CC-DP:EES(n=1596):SS-DP:SES(n=1600)	1:1	36	CV death		10.1%:11.5%; noninferiority P<.001; and superiority (P=.19)	similar clinical outcomes but EES superior to SES regarding TLF (8.8% versus 11.4%; P=0.01).
<b>SORT OUT IV(122)</b>	2012	RT	Abbott Vascular, Boston Scientific, and Cordis, Johnson & Johnson	All (2774)	CC-DP-EES(1390):SS-DP-SES(1384)	1:1	18	MACE		7.2%:7.6%, HR=0.94, IC95% 0.67-1.31; (p=.01)	in favor of CC- DP-EES
<b>SORT OUT IV(129)</b>	2014	RT	Abbott Vascular, Boston Scientific, and Cordis, Johnson & Johnson	All (2774)	CC-DP-EES(1390):SS-DP-SES(1384)	1:1	36	MACE		9.8%:11.1%, HR=0.89, IC95% 0.70-1.12 p=NS	similar clinical outcomes
<b>SORT OUT IV(123)</b>	2016	RT	Abbott Vascular, Boston Scientific, and Cordis, Johnson & Johnson	All (2774)	CC-DP-EES(1390):SS-DP-SES(1384)	1:1	60	MACE		14%:17.4%, HR: 0.80, IC95%0.66- 0.97, p=.02	in favor of CC- DP-EES

Table 1.9b - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>XAMI</b> (119)	2015	RT-post hoc	Abbott vascular	ACS (620)	CC-DP- EES(400);SS-DP- SES(220)	2:1	36	MACE		8.0%:10.5%(p=.30)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE</b> (58)	2014	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP- SES(1063);CC-DP- EES(1056)	1:1	12	TLF		6.5%:6.6% (p for non-inferiority <0.0004)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE</b> (61)	2015	RT	Biotronik	Diabetics (486)	CC-BP- SES(257);CC-DP- EES(229)	1:1	12	TLF		10.9%:9.3% (HR=1.19; IC95% 0.67-2.10; p=0.56)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE</b> (57)	2016	RT	Biotronik	ACS (407)	CC-BP- SES(211);CC-DP- EES(196)	1:1	12	TLF		3.4%:8.8% (RR=0.38, IC95% 0.16-0.91, p=0.024)	In favor of CC- BP-SES in STEMI patients
<b>BIOSCIENCE</b> (59)	2016	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP- SES(1063);CC-DP- EES(1056)	1:1	24	TLF		10.5%:10.4% (RR=1.00, IC95% 0.77-1.31, p=0.979)	similar clinical outcomes
<b>BIOSCIENCE</b> (60)	2018	RT	Biotronik	All (2119)	CC-BP- SES(1063);CC-DP- EES(1056)	1:1	60	TLF		20.2%:18.8% (RR=1.07 IC95% 0.88-1.31; p=0.487)	similar clinical outcomes
<b>RACES-MI</b> (120)	2014	RT	-	ACS (500)	EES(250);SES(250)	1:1	36	MACE		6%:20.8%, HR=0.75, IC95%0.5-1.13, (p=.17)	similar clinical outcomes
<b>RACES-MI</b> (121)	2016	RT	-	ACS (500)	EES(250);SES(250)	1:1	84	MACE		23.8 vs 34.1%, (p=.028)	in favor of EES



Table 1.9b - suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>BIOFLOW II(83)</b>	2015	RT	Biotronik	All (452)	CC-BP- SES(298);CC-DP- EES(154)	2:1	12		TLF	6.5% : 8.0% (HR=0.82; IC95% [0.40-1.68], p=0.58)	similar clinical outcomes
<b>BIOFLOW V(63)</b>	2017	RT	Biotronik	All (1334)	CC-BP- SES(884);CC-DP- EES(450)	2:1	12	TLF		6%:10% (IC95% [- 6.84 to -0.29], p=0.0399)	In favor of CC- BP-SES
<b>DIABEDES (SORT OUT IV)(117)</b>	2015	RT	-	Diabetics (213)	CC-DP- EES(108);SS-DP- SES(105)	1:1	48		MACE	20.4%:23.8% (HR 0.84, IC95% 0.47- 1.49; p = 0.55)	similar clinical outcomes
<b>CENTURY II(87)</b>	2016	RT	Terumo	All (525)	CC-BP- SES(277);CC-DP- EES(248)	1:1	12	TLF		6.9%:7.7% (p=0.72)	similar clinical outcomes
<b>CENTURY II(88)</b>	2016	RT	Terumo	ACS (264)	CC-BP- SES(126);CC-DP- EES(138)	1:1	24	TLF		6.3%:6.5% (p = 0.95)	similar clinical outcomes
<b>BIO RESORT(86)</b>	2016	RT	Biotronik, Boston Scientific, Medtronic.	All (3514)	PC-BP- EES(1172);CC- DP- ZES(1173);CC- BP-SES(1169)	1:1:1	12	TVF		5%:5%:5% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>Lansky AJ(62)</b>	2016	PA (DESSOLVE I/II, ISAR TEST 4)	Micell Technologies	All (204, propensity matched)	CC-BP- SES(102);CC-DP- EES(102)		36	TLF		5.0%:12.5% (p=0.07)	similar TLF, but reduced CI-TLR with CC-BP-SES
<b>DESSOLVE III(95)</b>	2018	RT	Micell Technologies	All(1398)	CC-BP- SES(703);CC-DP- EES(695)	1:1	12	DOCE		5.8%:6.5% (non- inferiority=0.0001)	similar clinical outcomes

Table 1.9b: Essais randomisés comparant les stents libérant de l'évérolimus aux stents libérant du sirolimus de 1ère génération. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; CV death: Cardio-vascular death; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; ID/CI-TLR/TVR: Ischemia-driven/Clinically indicated Target Lesion/Vessel Revascularization; DOCE: Device-oriented composite endpoint.

Le deuxième principe actif introduit dans la seconde génération est le zotarolimus (ENDEAVOR<sup>®</sup>, RESOLUTE<sup>®</sup>, Medtronic). Cette revue de la littérature n'a pas permis d'identifier de comparaison directe entre PES et ZES (Zotarolimus-eluting stent). Dans l'étude pilote BASKET SMALL(130), 91 patients ont reçu un ZES et 100 un PES dans de vaisseaux de petits calibres (<3mm de diamètre). Après deux ans de suivi, le taux de MACE dans le groupe ZES était deux fois plus élevé que dans le groupe PES, sans toutefois de différence statistique (HR = 2,09, IC 95 % : 0,70-6,23, p = 0,19). Les ZES ont été comparés aux SES dans plusieurs essais (Table 1.10). Dans le plus important (PROTECT, 8 791 patients) (131,132), CC-DP-ZES s'est révélé non inférieur à SS-DP-SES à 48 mois en termes de mortalité toutes causes confondues et d'infarctus du myocarde grave (critères secondaires). Le taux de thrombose de stent démontrée ou probable (critère principal) était inférieur dans le groupe ZES (1,6% vs 2,6%[HR 0,63 (95% CI 0,46-0,85), P = 0,003]). Cependant, ces résultats sont contradictoires à ceux de l'étude SORT OUT III(133), qui visait à comparer le taux de MACE à 9 et 18 mois entre CC-DP-ZES et SS-DP-SES. Cet essai a conclu à la supériorité initiale du SES sur le ZES à 9 et 18 mois, avec des résultats cliniques similaires à 5 ans(134).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>SORT OUT III(133)</b>	2010	RT	Cordis, Medtronic	All(2332)	CC-DP- ZES(1162);SS- DP-SES(1170)	1:1	18	MACE		10%:5% (HR=2.19, IC95% 1.58-3.04; p<0.0001)	Superiority of SS-DP-SES
<b>SORT OUT III(134)</b>	2014	RT	Cordis, Medtronic	All(2332)	CC-DP- ZES(1162);SS- DP-SES(1170)	1:1	60	MACE		17.0%:15.6% (OR=1.10, IC95% 0.88-1.37, p=.40)	similar clinical outcomes
<b>PROTECT(131)</b>	2012	RT	Medtronic	All (8709)	CC-DP- ZES(4357);SS- DP-SES(4352)	1:1	36		stent thrombosis	1-4%:1-8%, [HR]=0.81, 95% CI 0.58-1.14 (p=0.22)	similar clinical outcomes
<b>PROTECT(132)</b>	2014	RT	Medtronic	All (8709)	CC-DP- ZES(4357);SS- DP-SES(4352)	1:1	48		CV death	1.6% :2.6% [HR]=0.63 (IC95%0.46- 0.85), (P=.003)	in favor of CC- DP-ZES
<b>PRISON III(135)</b>	2013	RT	Cordis	CTO (304)	phase 1 = SS-DP- SES(51);CC-DP- ZES(46) / phase 2 = SS-DP- SES(103);CC-DP- ZES(104)	1:1	12		MACE	p=NS	similar clinical outcomes
<b>PRISON III(136)</b>	2015	RT	Cordis	CTO (304)	phase 1 = SS-DP- SES(51);CC-DP- ZES(46) / phase 2 = SS-DP- SES(103);CC-DP- ZES(104)	1:1	36		MACE	p=NS	similar clinical outcomes
<b>DIRECT II(89)</b>	2016	RT	Svelte Medical Systems	All (159)	CC-BP- SES(108);CC-DP- ZES(51)	2:1	12		TVF	6.5%:9.8% (p=0.524)	similar clinical outcomes
<b>Wijns W(90)</b>	2016	PA (data from DISSOLVE II)	Micell Technologies	All (184)	CC-BP- SES(123);CC-DP- ZES(61)	2:1	24		MACE	6.7%:13.3% (p=0.167)	similar clinical outcomes
<b>ORIENT(94)</b>	2017	RT	BIOTRONIK Korea	All (372)	CC-BP- SES(250);CC-DP- ZES(122)	2:1	12		TLF	2.4%:3.3% (p=.621)	similar clinical outcomes

Table 1.10: Essais randomisés comparant les stents au zotarolimus (ZES) aux stents au sirolimus (SES) de première génération. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; CV death: Cardio-vascular death; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; CTO: chronic total occlusion.

Plusieurs essais(137–141) ont comparé directement le CC-DP-ZES au CC-DP-EES (Table 1.11). Étonnamment, tous ces essais ont conclu à la non-infériorité du ZES sur le EES, alors que comme démontré précédemment le EES semblait supérieur au SES, lui-même supérieur au ZES. Une seule étude(142), initialement conçue pour définir la meilleure durée de la double anti-agrégation plaquettaire entre 6 et 24 mois, a montré un taux cumulé de MACE inférieur à 2 ans avec EES (19,2% ; IC95%:16,0-22,8) par rapport à ZES (27,8% ; IC95% : 24,1-31,9).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>RESOLUTE- AC(137)</b>	2010	RT	Medtronic	All(2292)	CC-DP- ZES(1140);CC- DP-EES(1152)	1:1	12	TLF		8.2%:8.3% (p<.001)	similar clinical outcomes
<b>RESOLUTE- AC(143)</b>	2014	RT	Medtronic	All(2292)	CC-DP- ZES(1140);CC- DP-EES(1152)	1:1	48	TLF		15.2%:14.6%, (p=.68)	similar clinical outcomes
<b>RESOLUTE- AC(144)</b>	2015	RT	Medtronic	All(2292)	CC-DP- ZES(1140);CC- DP-EES(1152)	1:1	50	POCE		35.3%:32.0%, P=0.11	similar clinical outcomes
<b>RESOLUTE- AC(145)</b>	2016	RT-post hoc	Medtronic	ACS (280)	CC-DP- ZES(122);CC-DP- EES(158)	-	50	TLF		7.6%:10.4% (p=.304)	similar clinical outcomes
<b>TWENTE(138)</b>	2012	RT	Abbott Vascular and Medtronic	All except for ACS (1391)	CC-DP- ZES(697);CC-DP- EES(694)	1:1	12	TVF		8.2%:8.1, dif= 0.1 (IC95% -2.8-3.0) (pnoninferiority = 0.001 , p superiority=.94)	similar clinical outcomes
<b>TWENTE(146)</b>	2015	RT-post hoc	Abbott Vascular and Medtronic	Complex patients & exclusion of ACS (1033)	CC-DP- ZES(529);CC-DP- EES(504)	-	24	TVF		12.1%:12.3% (p=.92)	similar clinical outcomes
<b>TWENTE(147)</b>	2015	RT-post hoc	Medtronic	All & exclusion of ACS (1381)	CC-DP- ZES(692);CC-DP- EES(689)	-	36	TVF		12.1%:13.4% (p=.05)	similar clinical outcomes
<b>TWENTE(148)</b>	2015	RT-post hoc	Abbott Vascular and Medtronic	Bifurcation treatment & exclusion of ACS (362)	CC-DP- ZES(179);CC-DP- EES(183)	-	36	TVF		13.6%:12.6% (p=.78)	similar clinical outcomes
<b>ISAR-LEFT MAIN 2(139)</b>	2013	RT	-	unprotected left main coronary (650)	CC-DP- ZES(324);CC-DP- EES(326)	1:1	12	MACE		17.5%:14.3% (RR=1.26; IC95%=0.85-1.85; p = 0.25)	similar clinical outcomes

Table 1.11 - Suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>DUTCH PEERS(140)</b>	2014	RT	Boston Scientific, Medtronic.	All (1811)	CC-DP-ZES(906):PC-DP- EES(905)	1:1	12	TVF		6%:5% (non- inferiority p=0.006)	similar clinical outcomes
<b>DUTCH PEERS(149)</b>	2015	RT	Boston Scientific, Medtronic.	All (1811)	CC-DP-ZES(906):PC-DP- EES(905)	1:1	24	TVF		8.6%:7.8% (p = 0.55)	similar clinical outcomes
<b>DUTCH PEERS(150)</b>	2016	RT post- hoc	Boston Scientific, Medtronic.	ACS (817)	CC-DP-ZES(421):PC-DP- EES(396)	-	24	TVF		7.4%:6.1% (p= .45)	similar clinical outcomes
<b>DUTCH PEERS(151)</b>	2017	RT	Boston Scientific, Medtronic.	All (1811)	CC-DP-ZES(906):PC-DP- EES(905)	1:1	36	TVF		10.7%:10.3% (p Log-rank=0.77)	similar clinical outcomes
<b>DUTCH PEERS(152)</b>	2017	RT post- hoc	Boston Scientific, Medtronic.	High ACS risk patients (957)	CC-DP-ZES(481):PC-DP- EES(476)	-	36	TVF		63 (13.3) 62 (13.1) 1.01 (0.71-1.44) 0.95	similar clinical outcomes
<b>HOST ASSURE(141)</b>	2014	RT	Boston Scientific Korea	All (3755)	PC-DP-EES(2503)-CC-DP- ZES(1252)	2:1	12	TLF		2.88%:2.88% (HR=1.00, IC95%=0.67- 1.50, p=0.983)	similar clinical outcomes
<b>PRODIGY(142)</b>	2014	RT-post hoc	-	All (2013)	BMS(505):CC-DP- ZES(502):PES(505):EES(501)	1:1:1:1	24	MACE		32.1%(95%CI: 28.1-36.3); 27.8% (95%CI: 24.1-31.9):26.2% (95%CI: 22.5- 30.2):19.2% (95%CI:16.0- 22.8), (p = 0.00029)	in favor of EES
<b>BIO RESORT(86)</b>	2016	RT	Biotronik, Boston Scientific, Medtronic.	All (3514)	PC-BP-EES(1172):CC-DP- ZES(1173):CC-BP-SES(1169)	1:1:1	12	TVF		5%:5%:5% (p=NS)	similar clinical outcomes

Table 1.11: Essais randomisés comparant les stents au zotarolimus (ZES) aux stents à l'évérolimus (EES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; POCE: Patient-oriented composite endpoint.

Les stents à libération de biolimus (biolimus-eluting stents, BES) font également partie de la deuxième génération. Dans les essais NOBORI I(85) et BIOFREEDOM FIM(101), un SS-DP(ou)PF-BES a été comparé au SS-DP-PES (Table 1.12). Après 5 ans, les stents au BES semblaient non inférieurs aux stents au PES en ce qui concerne la mortalité cardio-vasculaire ou le taux MACE (critères secondaires), mais ces études n'ont pas été conçues avec la puissance requise pour ces analyses spécifiques. Plusieurs études ont comparé BES à SES (Table 1.12). L'essai SORT OUT VII(153,154) a comparé deux stents libérant du BES ou du SES via des polymères résorbables. Il a démontré une incidence plus faible de TLF à 12 mois avec le SES, mais des résultats similaires à 24 mois. Dans une analyse de sous-groupe de l'étude LEADERS(69) chez des patients atteints de syndrome coronarien aigu (SCA), le taux de MACE était plus faible à 5 ans avec le SS-BP-BES (18,2 %) qu'avec le SS-DP-SES (25,9 %, RR=0,67, IC95 %=0,47-0,95, p=0,025), ce qui souligne un avantage potentiel du SS-BP-BES dans cette population, mais qui pourrait tout autant résulter de l'utilisation de BP dans le groupe BES.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>NOBORI I(85)</b>	2015	RT		All (363)	SS-BP-BES(238);SS-DP-PES(125)	2:1	60		CV death	10.9%:11.2%	similar clinical outcomes
<b>BIOFREEDOM FIM(101)</b>	2016	RT	Biosensors Europe SA	All (182)	SS-PF-BES(60);SS-PF-BES Low dose(62);SS-DP-PES(60)	1:1:1	60		MACE	23.8% : 26.4% : 20.3% (p=NS)	similar clinical outcomes of SS-PF-BES and SS-DP-PES, inferiority of SS-PF-BES Low dose
<b>LEADERS(68)</b>	2011	RT	Biosensors Europe SA	All (1707)	SS-BP-BES(857);SS-DP-SES(850)	1:1	48	MACE		18.7%:22.6% (RR=0.81, IC95%=0.66-1.00, p for non-inferiority <0.0001)	similar clinical outcomes
<b>LEADERS(70)</b>	2015	RT post-hoc	Biosensors Europe SA	Bifurcation lesions (497)	SS-BP-BES(258);SS-DP-SES(239)	1:1	60	MACE		24%:29.3% (p0.20)	similar clinical outcomes on primary outcome, but in favor of BES in CI-TLR (10.1% vs. 15.9%, P = 0.0495), and CI TVR (12.0% vs. 19.2%, P = 0.023)
<b>LEADERS(69)</b>	2015	RT post-hoc	Biosensors Europe SA	ACS (573)	SS-BP-BES(280);SS-DP-SES(293)		60	MACE		18.2%:25.9% (RR=0.67, IC95%=0.47-0.95, p=0.025)	In favour of BP-BES versus DP-SES
<b>LEADERS(71)</b>	2016	RT post-hoc	Biosensors Europe SA	CTO patients (81)	SS-BP-BES(45);SS-DP-SES(36)		60	MACE		22.2%:38.9% (p = 0.147)	similar clinical outcomes on primary outcome, but in favor of BES in CI-TLR (11.1%:33.3% (p=0.0214)
<b>SORT OUT V(78)</b>	2013	RT	Terumo and Cordis, Johnson & Johnson.	All (2468)	SS-BP-BES (1229);SS-DP-SES(1239)	1:1	12	MACE		p=.06	similar clinical outcomes



Table 1.12 - Suite

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>SORT OUT V(79)</b>	2017	RT	Terumo and Cordis, Johnson & Johnson.	All (2468)	SS-BP-BES (1229);SS-DP- SES(1239)	1:1	60	MACE		14.8%:15.8%, OR=0.93, IC95% 0.75-1.16 (p=.53)	similar clinical outcomes
<b>DESTINY(155)</b>	2015	RT	Scitech Medical	All (170)	CC-BP- SES(114);SS-BP- BES(56)	2:1	12		MACE	6.3:9.5% (p=0.5)	similar clinical outcomes
<b>SORT OUT VI(154)I</b>	2016	RT	Biotronik, Terumo	All(2525)	CC-BP- SES(1261);SS- BP-BES(1264)	1:1	12	TLF		3.8%:4.6% (p<.0001)	in favor of CC- BP-SES
<b>SORT OUT VII(153)</b>	2018	RT	Biotronik, Terumo	All(2525)	CC-BP- SES(1261);SS- BP-BES(1264)	1:1	24	TLF		6.7%:7%, RR 0.94 IC95% 0.70-1.28 (p=.71)	similar clinical outcomes

Table 1.12: Essais randomisés comparant les stents au biolimus (BES) aux stents au paclitaxel (PES) ou au sirolimus (SES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; MACE: Major adverse cardiac event; CV death: Cardio-vascular death; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; CTO: chronic total occlusion.

Aucun essai n'a été conçu pour comparer directement des combinaisons similaires de stents et de polymères libérant du BES ou de l'EES (Table 1.13). Par contre, plusieurs essais(72,75,80) ont comparé SS-BP-BES à CC-DP-EES, avec des résultats cliniques similaires dans tous les cas. Une méta-analyse(66) de ces essais a révélé des taux similaires d'un critère composite incluant la mortalité cardiaque et le taux d'infarctus du myocarde lié au vaisseau cible à 36 mois (7,8 % vs 6,7 %,  $p = 0,07$ ), mais avec un taux significativement supérieur d'infarctus du myocarde associé au vaisseau cible dans le groupe SS-BP-BES (RR 1,36 ; 1,01-1,82,  $p = 0,04$ ).

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
NEXT(75)	2013	RT		All (3235)	SS-BP- BES(1617):CC- DP-EES(1618)	1:1	12		CI-TLR	3%:3% p=NS	similar clinical outcomes
NEXT(76)	2014	RT		All (3235)	SS-BP- BES(1617):CC- DP-EES(1618)	1:1	24	CV death		7.8%:7.7%; difference of 0.14% [upper 99.4% CI, 2.5%]; noninferiority P = .003	similar clinical outcomes
NEXT(77)	2015	RT		All (3235)	SS-BP- BES(1617):CC- DP-EES(1618)	1:1	36		CV death	9.9%:10.3% P noninferiority<0.0001 P superiority=NS	similar clinical outcomes
BASKET PROVE II(80)	2015	RT		All (2291)	SS-BP- BES(765):CC-DP- EES(765):CC(761)	1:1:1	24	MACE		7.6% : 6.8% : 12.7%	similar clinical outcomes between DES, but superiority of SS-BP-BES to BMS
COMPARE II(72)	2013	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP- BES(1795):CC- DP-EES(912)	2:1	12	MACE		5.2%:4.8% (RR=1.07 IC95% 0.75–1.52; p non- inferiority<0.0001)	similar clinical outcomes
COMPARE II(73)	2015	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP- BES(1795):CC- DP-EES(912)	2:1	36	MACE		11.9%:11.1 % (p=0.57)	similar clinical outcomes
COMPARE II(93)	2017	RT	Abbott vascular, Boston Scientific	All (2707)	SS-BP- BES(1795):CC- DP-EES(912)	2:1	60	MACE		17.3%:15.6% (p=0.26)	similar clinical outcomes
LONG DES V(81)	2014	RT	Terumo Korea	De Novo Native Long Coronary Artery Lesions (500)	SS-BP- BES(245):PC-DP- EES(255)	1:1	12		MACE	16.7% :16.5% (P=.94)	similar clinical outcomes
EVERBIO II(49)	2017	RT	Abbott Vascular, Biosensor Int, Boston Scientific	All (238)	BVS-EES(78):PC- DP-EES(80):SS- BP-BES(80)	1:1:1	24		DOCE	21%:16%:9% (p=NS)	similar clinical outcomes
Vlachojannis(66)	2017	PA (NEXT et COMPARE II)	Terumo Europe	All (5942)	SS-BP- BES(3412):CC- DP-EES(2530)		36		CV death	5.6%:4.5% (HR 1.36; IC95%1.01-1.82, p=0.04)	in favor of CC- DP-EES  TV-MI rates were higher with BP-BES

Table 1.13: Résultats des essais randomisés comparant les stents libérant du biolimus et de l'évérolimus (BES vs EES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, FU: Follow-up; MACE: Major adverse cardiac event; CV death: Cardio-vascular death; ID/CI-TLR/TVR: Ischemia-driven/Clinically indicated Target Lesion/Vessel Revascularization; DOCE: Device-oriented composite endpoint.

Deux essais ont comparé le BES au ZES sur des plateformes différentes (SS-BP-BES et CC-DP-ZES) (Table 1.14). L'étude SORT OUT VI(64,65) portant sur 2999 patients a montré des résultats similaires en termes de TLF à 12 mois et de MACE à 36 mois entre ces deux stents.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
CTO IVUS(63)	2015	RT	-	All (402)	CC-DP- ZES(201);SS-BP- BES(201)	1:1	12		MACE	4,0%;5,7% (p=0,45)	similar clinical outcomes
SORT OUT VI(63)	2015	RT	Biosensors International, Medtronic Cardiovascular	All (2999)	CC-DP- ZES(1502);SS-BP- BES(1497)	1:1	12	TLF		5,3%;5,0% (p non- inferiority=,004)	similar clinical outcomes
SORT OUT VI(64)	2017	RT	Biosensors International, Medtronic Cardiovascular	All (2999)	CC-DP- ZES(1502);SS-BP- BES(1497)	1:1	36	MACE		8,6%;9,6% (p=,36)	similar clinical outcomes

Table 1.14: Comparaison des stents libérant du biolimus et du zotarolimus (BES vs ZES). RT: randomized trial, PA: pooled analysis, FU: Follow-up, MACE: Major adverse cardiac event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure.

Cette revue de la littérature a permis d'identifier quatre autres molécules thérapeutiques (Table 1.15). La première est une combinaison de probucol et de SES, délivrée via un stent en SS sans polymère (SS-PF-SPES, stent Dual<sup>®</sup>, groupe ISAR). Il a été comparé à un stent de deuxième génération (CC-DP-ZES) dans l'essai randomisé ISAR TEST 5(97,100) avec un taux similaire de DOCE à 12 et 60 mois. Dans l'essai EXCELLA II(156), un stent en CC délivrant du novolimus (NES, un métabolite du sirolimus) via un polymère non-résorbable a été comparé à CC-DP-ZES chez 210 patients. Le critère d'évaluation principal de l'étude était la TAT évaluée par coronarographie quantitative (QCA) à neuf mois, mais les patients étaient suivis jusqu'à cinq ans avec un taux de POCE inférieur dans le groupe NES (23,7 % vs 40,8 %, RR 0,53, IC95 % : 0,32-0,87, p = 0,013). Dans l'étude randomisée BIONICS(157), un autre analogue de la rapamycine, le ridaforolimus (RES), a été comparé à une stent similaire libérant du ZES chez 1919 patients. Après 12 mois, le taux de TLF était similaire dans les deux groupes et le RES était considéré comme non inférieur au ZES. Enfin, dans l'essai REMEDEE-OCT(158), une stent en SS délivrant du SES associé aux anticorps CD34 (SS-DP-AntiCD34-SES) a été comparé au CC-DP-EES chez 60 patients. Le principal résultat de cette étude était le pourcentage de mailles non-endothélialisées qui restait moindre dans le groupe CC-DP-EES (14,7% vs 7,7% ; p = 0,04). À 12 mois, le taux de MACE était similaire entre les deux stents, mais l'étude n'était pas assez puissante pour conclure sur ce paramètre.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
ISAR TEST 5(97)	2011	RT	-	All (3002)	SS-PF- SPES(2002)-CC- DP-ZES(1000)	2:1	12	DOCE		13.1%:13.5% (p noninferiority=0.006)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(98)	2016	RT	-	All (3002)	SS-PF- SPES(2002)-CC- DP-ZES(1000)	2:1	60	DOCE		23.8%:24.2% (HR=0.98 IC95%=0.84-1.15 p=0.80)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(100)	2017	RT post- hoc	-	ACS (311)	SS-PF- SPES(215)-CC- DP-ZES(96)		60	DOCE		18.3%:20.1% (HR=0.87, IC95%=0.50-1.51 p = 0.62)	similar clinical outcomes
ISAR TEST 5(99)	2016	RT post- hoc	-	Diabetics (870)	SS-PF- SPES(575)-CC- DP-ZES(295)		60	DOCE		32.9%:33.4% (HR=0.98, IC95%=0.76-1.26, p=0.88)	similar clinical outcomes
EXCELLA II(156)	2016	RT	Elixir Medical Corp	All (210)	CC-DP- NES(139):CC- DP-ZES(71)	2:1	60		POCE	23.7%:40.8% (HR 0.53, IC95%: 0.32-0.87, p=0.013)	In favour of NES, but not powered for a clinical outcome
BIONICS(157)	2017	RT	Medinol Ltd	All (1919)	CC-DP- RES(958):CC- DP-ZES(961)	1:1	12	TLF		5.4%: 5.4% (Pnoninferiority=0.001)	similar clinical outcomes
REMEDEE- OCT(158)	2017	RT	OrbusNeich Medical	ACS (60)	SS-DP- AntiCD34- SES(29):CC-DP- EES(31)	1:1	12		MACE	0%:3.3% (p=1.0)	similar clinical outcomes

Table 1.15: Essais randomisés comparant de nouveaux principes actifs. RT: randomized trial, PA: pooled analysis, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; ACS: Acute coronary syndrome; MACE: Major adverse cardiac event; TLF/TVF: Target Lesion/Vessel Failure; DOCE: Device-oriented composite endpoint; POCE: Patient-oriented composite endpoint.

### 2.2.2. Artère fémorale superficielle (*Superficial femoral artery, SFA*)

Seuls quatre essais randomisés consacrés à l'évaluation des DES dans la SFA ont été identifiés (Table 1.16). La majorité des patients inclus dans ces études souffraient de claudication, et une plus faible proportion d'ischémie critique.

L'essai ZILVER PTX(159,160) a comparé un stent en NiTiNOL auto-expansible sans polymère (Ni-PF-PES) à l'angioplastie transluminale standard (PTA) avec implantation de stent métallique nu si échec de PTA. A un an et cinq ans, le taux de survie sans événement (défini comme l'absence de décès, d'amputation majeure, d'ischémie du membre cible nécessitant une intervention chirurgicale ou une réparation chirurgicale du vaisseau cible et d'une détérioration du score de Rutherford d'au moins 2 classes ou d'un passage à la classe 5 ou 6) était significativement plus faible avec le DES.

Dans l'étude IMPERIAL(161), un nouveau stent en Ni-DP-PES (Eluvia<sup>®</sup>, Boston Scientific) était comparé au Ni-PF-PES (Zilver PTX<sup>®</sup>, Cook Medical) avec une hypothèse de non infériorité. Après 12 mois, le critère composite incluant toutes les causes de décès, l'amputation majeure et le TLR présentait des taux similaires dans les deux groupes (94-9% contre 91-0%, p non-infériorité <0,0001).

Deux essais (RELINE et VIASTAR)(162,163) ont évalué un stent en NiTiNOL auto-expansible recouvert de polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) et libérant de l'héparine via un polymère durable (polyéthylèneimine, PEI), désigné comme Ni-DP-HEP. Dans l'essai RELINE, l'efficacité du Ni-DP-HEP a été comparée à celle du PTA sur le taux de RIS. Le principal résultat était le taux de perméabilité primaire à 12 mois, qui était grandement amélioré dans le groupe Ni-DP-HEP. Cependant, le succès clinique, défini comme une amélioration d'au moins une catégorie sur l'échelle de Rutherford par rapport à la classification antérieure à l'intervention, était similaire dans les deux groupes (93,6% dans le groupe Ni-DP-HEP contre 87,8% dans le

groupe PTA (p=NS)). Dans l'étude VIASTAR(163,164), le Ni-DP-HEP était comparé à un BMS similaire chez des patients présentant des lésions de novo. Après 24 mois, le taux de perméabilité primaire (critère de jugement primaire) était significativement meilleur avec le Ni-DP-Hep qu'avec le BMS (63,1 (95 % IC 0,52-0,76) contre 41,2 % (95 % IC 0,29-0,57 ; log-rank  $p = 0,04$ ), mais avec des résultats cliniques similaires (amélioration du classement Rutherford  $\geq 1$ , 78% contre 75 % respectivement, p=NS).



Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>ZILVER PTX(159)</b>	2011	RT	Cook Medical	Rutherford≥2 (474)	Ni-PF-PES (236):PTA(238)	1:1	12	EFS	-	90.4%:82.6%; P=0.004	in favor of Ni- PF-PES
<b>ZILVER PTX(165)</b>	2014	RT-post hoc	Cook Medical	Rutherford≥2 (474)	Ni-PF-PES (236):PTA(238)	1:1	24	EFS	-	92.0%:85.0% (p=0.61)	similar clinical outcomes
<b>ZILVER PTX(160)</b>	2016	RT	Cook Medical	Rutherford≥2 (474)	Ni-PF-PES (236):PTA(238)	1:1	60	EFS	-	81.4%:70.1% (Kaplan- Meier estimates) (p<0.01)	in favor of Ni- PF-PES
<b>RELINE(162)</b>	2015	RT	-	Rutherford 2-5 with ISR (83)	Ni-DP- HEP(39):PTA(44)	1:1	12	-	Clinical success*	93.6%: 87.8% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>VIASTAR(163)</b>	2013	RT	-	Rutherford 2-5 (141)	Ni-DP- HEP(72):BMS(69)	1:1	12	-	Rutherford improvement ≥ 1	84.0%:84.0% (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>VIASTAR(164)</b>	2015	RT	-	Rutherford 2-5 (141)	Ni-DP- HEP(72):BMS(69)	1:1	24	-	Rutherford improvement ≥ 1	78%:75 % (p=NS)	similar clinical outcomes
<b>IMPERIAL(161)</b>	2018	RT	Boston Scientific	Rutherford 2-4 (465)	Ni-DP- PES(309):Ni-PF- PES(156)	2:1	12	All death, major amputation, TLR	-	94.9%:91.0% (p non- inferiority<0.0001)	similar clinical outcomes

Table 1.16: Essais randomisés évaluant les stents actifs dans l'artère fémorale superficielle (SFA). RT: randomized trial, RT post-hoc: Post-hoc analysis of a randomized trial, FU: Follow-up; EFS, event-free survival included major adverse events (death, amputation, CI-TLR, target limb ischemia requiring surgical intervention, or surgical repair of the target vessel) and worsening of the Rutherford score by 2 classes, or to class 5 or 6. (\*) Clinical success was defined as ≥1 category improvement in the Rutherford scale compared with the pre-procedure classification.

### 2.2.3. Artères sous le genou (below-the-knee, BTK)

Deux essais ont porté sur les résultats de la première génération de DES dans les lésions sous-gonale (table 1.17). Dans l'étude ACHILLES(166,167), un SS-DP-SES (Cypher®, Cordis) a été comparé à une PTA standard chez des patients atteints d'ischémie critique des membres (critical limb ischemia, CLI). À un an, la survie estimée sans décès et/ou TLR, pontage/amputation et classification dans une catégorie Rutherford  $\geq 4$  était significativement plus élevée dans le groupe SS-DP-SES. Bien que non significatif, il est intéressant de souligner que les taux de mortalité (10,1 vs 11,9 %,  $p = 0,822$ ), de TLR sur arguments cliniques (10,0 vs 16,5 %,  $p = 0,257$ ), d'amputation des membres index (13,8 vs 20,0 %,  $p = 0,307$ ) étaient toutefois tous inférieurs dans le groupe SS-DP-SES avec un taux de cicatrisation supérieur (72,3 % vs 56,5 %,  $p = 0,132$ ).

L'étude PADI(168,169) a comparé un SS-DP-PES (Taxus®, Boston) au PTA avec stenting si besoin par stents métalliques nus chez des patients en CLI. Après 2 et 5 ans, les taux d'amputations majeures étaient plus faibles dans le groupe SS-DP-PES mais sans différence significative.

Essai 1er Auteur	Année	Type d'étude	Financement industriel	Population (n)	Groupes (n)	Ratio	Suivi (mois)	Critère de jugement principal clinique	Critère de jugement secondaire clinique	Résultats principaux	Conclusion principale
<b>ACHILLES(166)</b>	2012	RT	Cordis	CLI (200)	SS-DP- SES(99);PTA(101)	1:1	12	-	Freedom from death, TLR, bypass/amputation, Rutherford≥4	(p=0.028)	in favor of SS- DP-SES
<b>ACHILLES(167)</b>	2016	RT	Cordis	CLI (200)	SS-DP- SES(99);PTA(101)	1:1	12	Wound closure	-	72.3%:56.5% (p=0.132)	similar clinical outcomes, but trend to less major amputation with DES
<b>PADI(168)</b>	2016	RT	-	CLI (137)	SS-DP- PES(74);PTA+/- BMS(67)	1:1	24	-	major amputation	11.4%(95%CI, 4.0%– 18.8%):20.5%(95%CI, 10.5%–30.5%) (p=0.066)	similar clinical outcomes
<b>PADI(169)</b>	2017	RT	-	CLI (137)	SS-DP- PES(74);PTA+/- BMS(67)	1:1	60	major amputation	-	19.3%:34.0% (p=0.091)	similar clinical outcomes, but trend to less major amputation with DES

Table 1.17: Essais randomisés étudiant l'impact des stents actifs dans les lésions artérielles sous le genou. RT: randomized trial; FU: Follow-up; CLI: Critical limb ischemia; TLR: target lesion revascularization.

### 2.3. Discussion

La première génération de stents actifs a démontré une réduction significative du risque de RIS par rapport au BMS, le sirolimus ayant démontré des résultats plus favorables que le paclitaxel en ce qui concerne l'infarctus du myocarde et les thromboses tardives de stents(170). Les préoccupations soulevées par l'augmentation du taux de TAT et la nécessité d'une double antiagrégation plaquettaire prolongée ont mené au développement de la deuxième génération de DES. Les polymères biocompatibles, résorbables ou non, ont démontré leur supériorité par rapport aux polymères non-résorbables de première génération(171). Il est intéressant de noter qu'il n'existe aucune preuve claire de la supériorité des polymères résorbables sur les polymères biocompatibles non-résorbables de deuxième génération(67,171). Le stent avec le plus haut niveau de preuve en termes de sécurité et d'efficacité (Xience®, Abbott Vascular/Promus®, Boston Scientific) est d'ailleurs basé sur un polymère non-résorbable (PBMA et PVDF-HF libérant de l'évérolimus). En effet, une méta-analyse(172) comparant un BP-EES (Synergy®, Boston Scientific) à ce DP-EES et à un DP-ZES a révélé un taux similaire de MACE après un an. De plus, les plates-formes sans polymère actuellement disponibles, qu'elles libèrent du sirolimus ou du paclitaxel, n'ont pas démontré de supériorité par rapport au CC-DP-EES. Cela suggère que l'efficacité et l'innocuité d'un DES sont obtenues par une combinaison optimale de polymère et de principe actif plutôt que par la nature du polymère.

À la suite des leçons apprises de la première génération, le paclitaxel a presque complètement disparu des générations suivantes (au niveau coronaire) avec une préférence pour la famille des limus. Les stents à élution d'évérolimus, comme nous l'avons mentionné plus haut, présentent actuellement le niveau de preuve le plus élevé en matière d'innocuité et d'efficacité(171,173). Le Zotarolimus, d'autre part, a montré des résultats controversés et en

particulier de manière inconstante sa non-infériorité à la première génération de DES(131–133). Étonnamment, dans plusieurs essais(137–140), le ZES a été jugé non inférieur au EES. Toutefois, plusieurs méta-analyses réalisées à partir de ces essais(173–175) ont révélé que l'innocuité et l'efficacité de l'évérolimus étaient supérieures à celles du zotarolimus. Le biolimus a présenté des résultats prometteurs, mais dans une large méta-analyse publiée par Kang et al.(176), on constatait son infériorité à CC-DP-EES et CC-BP-SES en termes de thrombose de stent, probable ou confirmée, à un an. Trois des autres agents thérapeutiques identifiés dans cette revue de littérature (probucol+sirolimus, novolimus, ridaforolimus) ont été trouvés non inférieurs au zotarolimus, mais non malheureusement pas été comparés à l'évérolimus. Le stent Combo Dual® (OrbusNeich Medical), libérant des anticorps CD34 et du sirolimus était le seul stent comparé à ce gold-standard, mais était jugé inférieur au CC-DP-EES sur le pourcentage de mailles non-endothélialisées à un an, avec cependant des taux de MACE équivalents(158).

Les résultats actuels de la troisième génération n'atteignent pas les attentes initiales. Bien qu'ils répondent à toutes les préoccupations théoriques soulevées par la première génération, les stents résorbables ABSORB® (Abbott Vascular) chargés d'évérolimus ont démontré un taux de thrombose de stent supérieur au CC-DP-EES(176). L'une des raisons possibles serait que les mécanismes de résorption qui sont liés à une réponse inflammatoire conduisent à un cercle vicieux se terminant par un risque accru de RIS et de thrombose aiguë tardive. De plus, ces structures en polymère n'ont pas une force radiale comparable aux stents métalliques classiques, ce qui imposent de conserver une épaisseur de maille beaucoup plus importante (157µm pour les ABSORB® et 170µm pour les NeoVas®), augmentant les traumatismes de la paroi artérielle et le risque de resténose(177).

Comme le démontre cette revue de littérature, il existe un écart important entre les technologies actuellement disponibles aux membres inférieurs et en coronaire, les chirurgiens vasculaires et radiologues interventionnels ayant commencé à utiliser des DES une décennie après les cardiologues interventionnels. À la suite du succès rencontré par les DES en cardiologie, quelques stents ont été conçus spécifiquement pour la SFA afin de prévenir la RIS. Le premier était un stent auto-expansible à élution de sirolimus (S.M.A.R.R.T, Cordis). Cette endoprothèse a été évaluée dans les études SIROCCO(178,179), mais même si son innocuité et son efficacité ont été démontrées, elle n'a pas démontré sa supériorité par rapport aux BMS. Un stent auto-expansible à élution d'évérolimus (DYNALINK-E, Abbott Vasculaire) a également été mis au point et implanté chez 104 patients dans le registre STRIDES(180). Cependant, à 12 mois, la perméabilité primaire n'était que de  $68 \pm 4,6 \%$ , et aucune autre étude randomisée n'a été effectuée. Le stent suivant était le Zilver PTX<sup>®</sup> (Cook Medical), une plateforme NiTiNOL auto-expansible libérant du paclitaxel. Le paclitaxel est un médicament hautement lipophile qui possède la propriété intéressante "d'adhérer" aux matériaux métalliques ou plastiques, ce qui explique son utilisation importante dans les DES ou dans les ballons actifs (drug-eluting balloon, DEB). Le Zilver PTX<sup>®</sup> a démontré des résultats améliorés et soutenus en termes de perméabilité primaire et de survie sans événement (event-free survival, EFS, incluant les événements indésirables majeurs (décès, amputation, CI-TLR, ischémie du membre cible nécessitant une intervention chirurgicale ou réparation chirurgicale du vaisseau cible) et l'aggravation du score Rutherford par 2 classes ou par classe 5 ou 6) à 1 et 5 ans par rapport au PTA avec implantation de stent métallique nu en cas d'échec(159,160). Un deuxième stent à élution de paclitaxel (Eluvia<sup>®</sup>, Boston Scientific) sur une plateforme en nitinol mais via cette fois un polymère non-résorbable (PBMA et PVDF-HFP, comme pour les stents Xience<sup>®</sup> et Promus<sup>®</sup>) a été développé. Dans l'étude IMPERIAL(161), Eluvia<sup>®</sup> s'est révélé

non inférieur à Zilver PTX® à un an sur un critère composite associant la mortalité toutes causes confondues, le taux d'amputations majeures et le TLR.

Le paclitaxel a démontré des résultats décevants en cardiologie, surtout lorsqu'on le compare à d'autres DES. Il est donc surprenant que la plupart des stents actifs développés pour la SFA soit à base de paclitaxel. Pour ajouter à la controverse, en décembre 2018, Katsanos et al. publiaient une méta-analyse(181) sur la sécurité des technologies à base de paclitaxel dans la SFA et dans l'artère poplitée. Bien que les DES et DEB à base de paclitaxel aient montré des taux de perméabilité primaire supérieurs à l'angioplastie ou aux BMS, les résultats de cette méta-analyse ont montré une relation significative entre l'utilisation de stents ou de ballons éluant du paclitaxel et la mortalité globale après 2 ans, ce qui, en accord avec le niveau de preuve actuel et le principe de précaution, devrait amener chirurgiens vasculaires et radiologues interventionnels à une utilisation prudente de ces technologies.

Un autre point troublant vient de la nature des agents thérapeutiques actuels qui sont employés dans la deuxième et troisième génération de DES. Il est bien admis que le principe actif idéal devrait avoir des propriétés pro-cicatrisantes (c'est-à-dire inhiber les SMC tout en favorisant la prolifération des EC pour restaurer une paroi vasculaire fonctionnelle). Cependant, presque tous les DES actuellement disponibles utilisent du paclitaxel ou des analogues du sirolimus, dont les propriétés antiprolifératives ont été identifiées comme un mécanisme sous-jacent de TAT. L'une des explications possibles est que les coûts de développement et d'évaluation d'un DES qui libérerait un agent thérapeutique totalement nouveau (non encore approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) ou la Commission européenne) seraient exorbitants, et qu'il est plus rentable pour un industriel de positionner

sur le marché un produit équivalent (non-inférieur) au gold-standard actuel dont les composants ont déjà été validés par la FDA ou la Commission européenne.

#### 2.4. Conclusion

Les DES ont permis une amélioration significative de la prise en charge des patients en cardiologie. Les phénomènes de thrombose aigue tardive ont été limités par la seconde génération de DES, mais cette dernière ne répond pas à toutes les problématiques soulevées par la première génération. Les résultats cliniques de la troisième génération de DES sont décevants, et il n'y a à l'heure actuelle aucun stent pro-cicatrisant visant à restaurer la fonction endothéliale.

### 3. Pistes de recherche et voies de développement

#### 3.1. Les plateformes résorbables

Les nouvelles méthodes de production comme les techniques de fabrication additive, et en particulier l'impression 3D, apparaissent comme des technologies-clés pour la production future de supports vasculaires résorbables, en polymère ou en métal. L'évaluation *in-vivo* du premier stent imprimé en 3D, conçu en PLGA/PEG, a révélé une libération progressive de sirolimus sur 30 jours avec une diminution significative de la prolifération néointimale (20,7% vs 35,9%) et des dépôts de fibrine (score 1,8 vs 2,5) comparativement aux stents nus classiques(182). Outre les techniques de fabrication citées ci-dessus, d'autres technologies actuellement évaluées, telles que le dépôt couche par couche (layer-by-layer), l'électrospinning ou le dépôt électrostatique de poudre, pourraient donner plus de souplesse aux propriétés mécaniques des stents.



### *Structures métalliques*

L'acier et le magnésium ont été utilisés pour la conception de stents résorbables. L'acier présente une résorption trop lente et a rapidement été abandonné(183). Le magnésium, matériau métallique résorbable, présente une excellente biocompatibilité et hémocompatibilité. De plus, il libère en se dégradant des charges électro-négatives qui pourraient avoir un effet anti-thrombogène(20). Il est cependant difficile de trouver un compromis entre la qualité des propriétés mécaniques, la vitesse de résorption et l'épaisseur des mailles. En effet, les premières études cliniques ont confirmé une résorption trop rapide (1-2 mois) avec une perte précoce des propriétés mécaniques(184). Plusieurs modifications dans la composition de l'alliage de magnésium ont permis d'améliorer ce problème, même si les résultats restent limités (183). A l'heure actuelle, plusieurs traitements de surface des stents en magnésium (plasma, anodisation, dépôt par électrophorèse, ...) sont à l'étude et permettraient d'améliorer la résistance à la corrosion et de préserver les propriétés mécaniques(185). Une autre possibilité serait de combiner cette technologie avec un polymère de surface afin de ralentir sa dégradation, comme le PLLA(186).

### *Structures polymériques*

Outre le PLLA, utilisé pour la conception des stents résorbables ABSORB® d'Abbott, d'autres polymères résorbables ont été étudiés tel que les polycarbonates dérivés de la tyrosine (ReSolve/ReZolve, REVA Medical) ou encore les polymères d'acide salicylique (IDEAL, Xenogenics) avec des résultats peu encourageants(187).

Parmi les polymères non résorbables, le polyuréthane (PU), déjà utilisé dans de nombreux dispositifs médicaux, présente une bonne biocompatibilité et hémocompatibilité, ainsi que des propriétés mécaniques intéressantes. Dès 2008, il a été étudié en combinaison avec le polycaprolactone (PCL) (70/30, PU/PCL) pour concevoir un stent à mémoire de forme qui

semble présenter une biocompatibilité correcte *in-vitro*(188). Cette piste n'a pas fait l'objet de nouvelles recherches depuis et semble avoir été abandonnée. L'équipe de Guerra et al. a toutefois suggéré en 2017 que l'association de PCL et d'acide poly-lactique (PLA) pouvait apporter à un biomatériau des caractéristiques mécaniques proche de celles requises par un stent vasculaire(189).

### 3.2. Les polymères bioinspirés

Comme évoqué précédemment, le caractère résorbable ou non des polymères utilisés ne semblent pas déterminant dans le contrôle de la réaction inflammatoire et de la RIS. La biocompatibilité du polymère reste en revanche un facteur essentiel. Ainsi, certains polymères non-résorbables et synthétiques, comme le Poly(butyl methacrylate) (PBMA) utilisé pour le stent XIENCE®/PROMUS® ont fait preuve de résultats cliniques tout à fait satisfaisants.

Une autre voie intéressante et celle ouverte par les polymères bioinspirés. Parmi les polymères prometteurs, l'amidon tient une place de choix. Ce polymère naturel présente une faible réponse inflammatoire, de bonnes propriétés mécaniques et une excellente intégration tissulaire(190). Il a été utilisé dans la fabrication de stents pour le traitement des conduits salivaires(191).

En 2007, Lee et al.(192) proposait une approche biomimétique de fonctionnalisation d'une large gamme de matériaux, notamment métalliques comme l'acier 316L, le titane ou le CoCr, à partir d'un processus d'auto-polymérisation de la dopamine, inspiré de la composition du mucus sécrété par les moules pour adhérer aux surfaces humides. Ce polymère, appelé polydopamine (PDA), présenterait également *in-vitro* des propriétés pro-cicatrisantes sur la paroi artérielle, c'est à dire qu'il régulerait la prolifération des SMC, tout en favorisant la prolifération des cellules endothéliales(193,194). Récemment, notre groupe a exploité cette couche adhésive de PDA pour permettre l'immobilisation d'un système de libération contrôlée

de principe actif à base de polycyclodextrine (PCD) sur un stent vasculaire en CrCo(223) et sur des surfaces en titane(224).

### 3.3. Les systèmes « polymer-free »

Outre les DES à base de paclitaxel, dont les propriétés lipophiles permettent son adhésion sur les surfaces métalliques sans utilisation de polymère, une autre stratégie basée sur la conception de réservoirs a été développée. Ces réservoirs correspondent à des micro- ou nano-cavités de surface qui permettent de stocker du principe actif. On retrouve dans cette catégorie, les stents Yukon (Translumina) et BioFreedom (Biosensor) (195), libérant respectivement du sirolimus et du biolimus par l'intermédiaire de microporosités, ou encore les stents Nano+ (Lepu) libérant du sirolimus et Bicare (Lepu) (196) libérant du sirolimus et du probucol, dont les surface ont été retravaillées pour présenter des nanoporosités.

Certains stents disposent de cavités plus importantes, traversantes, comme le Conor Stent et le NEVO Stent (J&J), ou uniquement pariétales comme le JacktaxStent (Boston Scientific) et le Cre8 (CID) (197). La plupart de ces stents utilisent en réalité des polymères résorbables qui recouvrent uniquement la surface des réservoirs pour contrôler l'immobilisation et la libération de principes actifs.

Une autre stratégie est de déposer sur la surface métallique un revêtement minéral, l'hydroxyapatite, dont la microporosité permet de capter du sirolimus (VESTASyn®, MIV Therapeutics)(198).

### 3.4. Les principes actifs innovants et la thérapie ciblée

Plusieurs pistes sont à l'étude pour l'évaluation de principes actifs non-cytotoxiques. Parmi celles-ci, on retrouve des molécules habituellement administrées par voie systémique telles

que les héparines(199) et autres anticoagulants, les antiagrégants plaquettaires, les statines et leurs dérivés(200), les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine ainsi que le cilostazol(201) mais également des médicaments anti-inflammatoires ou anti-oxydants.

Les statines semblent tenir une place de choix pour lutter contre la resténose par l'intermédiaire de leur effet pléiotrope. *In vitro* et *in vivo*, elles ont montré une réduction de la réaction inflammatoire, de l'adhésion plaquettaire et de la formation de néointima, notamment via une inhibition sélective de la prolifération des SMC(202–204). Elle possède également un effet bénéfique sur la fonction endothéliale en favorisant localement la production de monoxyde d'azote (NO). L'évaluation clinique d'un stent libérant de la simvastatine (SIMVASTENT) versus le Xience® chez 42 patients a cependant montré une prolifération néo-intimale plus importante à 6 mois en angiographie et en IVUS dans le groupe SIMVASTENT(205). Actuellement, la pitavastatine semble présenter les résultats les plus prometteurs sur l'inhibition des SMC. Dans une étude préclinique chez le porc(206), des stents libérant de la pitavastatine ont démontré une prévention de la RIS similaire au SES, sans défaut de réendothélialisation des mailles.

Les stents imprégnés d'héparine ont montré une réduction de leur thrombogénicité dans des modèles précliniques, mais peu d'impact sur la réendothélialisation et la RIS(207). L'Abciximab (anti-GPIIb/IIIa) a montré dans une étude clinique randomisée versus stent nu sur 96 patients une réduction de la RIS (37.9+/-6.25% pour les BMS vs. 18.9 +/- 5.54% pour les stents à l'Abciximab, p=0.008) et du taux de MACE sans thrombose aiguë de stent à 1 an(208).

Le stent Catania (CeloNova BioSciences, Newnan, Georgia) en CoCr est enduit d'une fine couche de Polyzene-F. Le Polyzene F est un polymère biocompatible possédant des propriétés anti-inflammatoires, bactério-résistantes et pro-cicatrisantes. Dans une cohorte de 300

patients, il a montré à 12 mois un taux de MACE de 8,8% et un taux de thrombose de 0,7% [138]. Il a récemment été comparé au Xience® dans un essai randomisé iranien incluant 83 patients. Il n'a pas été mis en évidence de différence significative entre les deux stents sur la mortalité, le TLR ou le taux d'infarctus du myocarde, mais le suivi n'était que de 3 mois(209).

D'autres travaux, notamment au sein de notre laboratoire dans le cadre des travaux de thèse de B. Maurel, ont porté sur l'évaluation *in-vivo* d'une drogue possédant un effet pro-cicatrisant, l'hémine, administrée par voie systémique (210). Cette drogue, substrat et activateur de l'Hème-Oxygénase 1 (HO-1), est connue pour son rôle essentiel dans la protection cardio-vasculaire au stress biologique, notamment par i) inhibition des mécanismes protéiques de prolifération cellulaire (211), ii) recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants (212), iii) effet anti-inflammatoire par sécrétion de monoxyde de carbone (CO) endogène (213) et iv) effet antiprolifératif des SMC de ses produits de dégradation (biliverdine) (214). Les travaux de Maurel et Hyvelin (210) ont permis de démontrer que l'administration systémique d'hémine permettait de réduire significativement la RIS tout en favorisant la réendothélialisation des mailles. Cependant, l'administration d'hémine chez l'Homme n'est possible que par voie intraveineuse, à bas débit, et a montré des effets hépatotoxiques à forte dose.

D'autres pistes étudient l'utilisation de thérapies géniques ou de cellules souches pour un traitement personnalisé et adapté aux spécificités de chaque patient(215). La thérapie génique, par transmission locale de plasmides, d'ARN ou d'ADN(216,217) via un stent, offre de nombreuses opportunités. Dans un modèle porcin, des stents libérant un gène promoteur du VEGF et du paclitaxel ont démontré une réendothélialisation complète à un mois, avec une réduction significative de la RIS par rapport au TAXUS®(218). Sharif et al.(219) ont également

proposé la transfection d'un gène promoteur de la synthèse de NO (eNOS) via des vecteurs d'adénovirus exprimés à la surface d'un stent. Ils ont démontré une réduction significative de la RIS à 1 mois dans un modèle de lapins hypercholestérolémiques. Plusieurs microARNs ont également été identifiés comme impliqués dans la RIS(220). Muthiah et al.(221) ont ainsi développé un stent libérant du microARN-145 qui *in-vitro* limiterait la prolifération des SMC. Hwang et al. ont également proposé l'immobilisation de cellules souches capables de synthétiser des facteurs paracrines sur un stent pour limiter la RIS. Les premiers essais chez le miniporc n'ont démontré aucune occlusion, thrombose ou rejet auto-immun après 7 jours(222).

#### 4. Hypothèses de travail

La fonctionnalisation d'un stent par PDA, polymère bioinspiré, pourrait permettre d'administrer localement une drogue sans être confronté aux effets toxiques de type hypersensibilité. L'administration locale d'hémine via un stent pourrait permettre de limiter la prolifération des SMC, et donc la RIS, tout en favorisant la cicatrisation de la paroi vasculaire par réendothélialisation des mailles, et ainsi prévenir du risque de TAT. Le but de ce travail est de développer et d'évaluer l'efficacité d'un nouveau concept de stent actif pro-cicatrisant sur une plateforme en chrome-cobalt, alliant un polymère bioinspiré et biocompatible, la polydopamine, à un principe actif pro-cicatrisant, l'hémine. Il est le fruit d'une collaboration étroite entre l'équipe « Ingénierie des Systèmes Polymères » de l'UMET (CNRS, UMR 8207, Université de Lille), le « Groupe de Recherche sur les Biomateriaux » de l'unité INSERM U1008 et le Service de Chirurgie Vasculaire de l'hôpital cardiologique du CHRU de Lille.



## CHAPITRE 2: UN POLYMERE BIOINSPIRE ET BIOCOMPATIBLE, LA POLYDOPAMINE

### 1. Introduction

La polydopamine (PDA) est un polymère inspiré du mucus adhésif sécrété par la moule marine. L'étude de ce mucus, qui lui permet de se fixer à tout type de surface, a permis d'identifier la présence majoritaire de deux protéines : la 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (ou DOPA) et la lysine. L'effet synergique de la fonction catéchol présente sur la DOPA et de la fonction amine présente sur la lysine est à l'origine des capacités adhésives observées. Partant de ces constatations, Lee et al. (192) ont émis l'hypothèse que la dopamine, possédant à la fois fonctions catéchol et amine, pouvait mimer les propriétés adhésives du mucus sécrété par les moules (Figure 2.1).

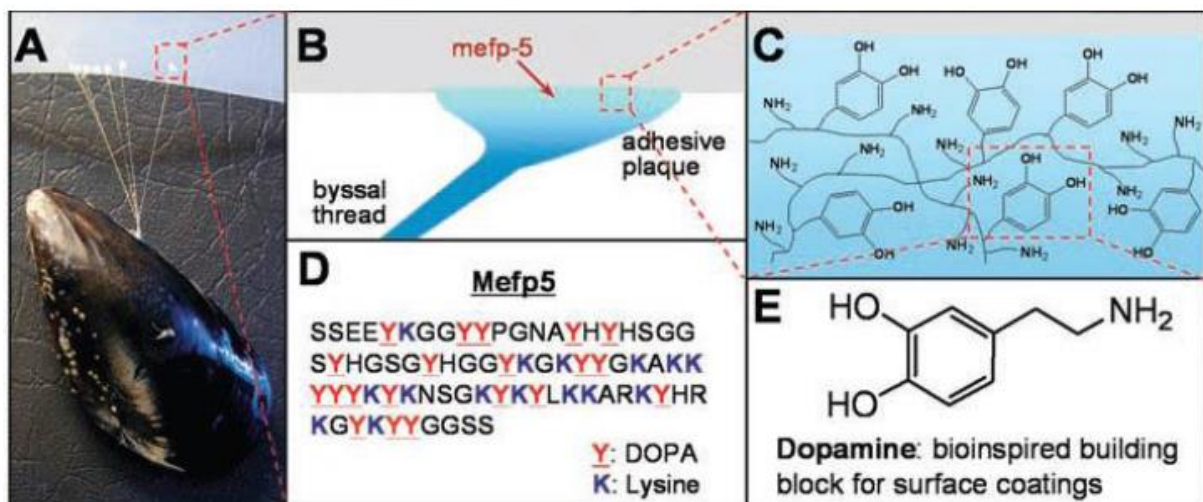


Figure 2.1: Moule marine (A). Adhésion du mucus par l'intermédiaire de mfp-5 (B), qui forme un réseau exprimant des fonctions catéchols et des fonctions amines (C). Ces fonctions proviennent de la DOPA et de la Lysine (D), qui sont toutes deux également présentes dans la molécule de dopamine (E). D'après Lee et al. (192).



En raison de ses fortes propriétés d'adhérence, de sa facilité d'utilisation et de sa biocompatibilité, la PDA a suscité un grand intérêt comme revêtement biomimétique pour la fonctionnalisation d'une large gamme de matériaux.

La PDA a également été utilisée dans le cadre d'applications vasculaires sur l'acier inoxydable 316L(225,226) ou les alliages de magnésium(226). Il a été démontré *in-vitro* qu'un revêtement de PDA pourrait favoriser la prolifération des cellules endothéliales tout en inhibant la prolifération des cellules musculaires lisses(194,225), proposant ainsi un effet pro-cicatrisant théorique sur la paroi vasculaire.

De plus, la PDA présentent une réactivité latente envers les nucléophiles tels que les amines et les thiols qui peut être exploitée pour ancrer d'autres principes actifs sur la surface du stent pour un effet synergique. Des études *in vivo* ont rapporté l'efficacité de divers médicaments immobilisés par la polydopamine(227–231) tels que la sélénocystamine, les CU-MOFs (cadres organiques métalliques à base de cuivre), l'Akt1-siRNA ou le VEGF sur la prolifération myointimale dans des modèles de rat, chien ou lapin. Cependant, aucune étude n'a rapporté un effet propre de la polydopamine *in-vivo* alors que son effet pro-cicatrisant *in-vitro* est bien décrit. L'objectif de ce chapitre est (i) d'étudier si la fonctionnalisation à la PDA selon le procédé utilisé dans notre laboratoire retrouve les propriétés pro-cicatrisantes rapportées *in-vitro* dans la littérature et (ii) d'évaluer *in-vivo* l'effet pro-cicatrisant de stents enduits de PDA dans un modèle de rat dédié à la RIS.

## 2. Produits, Matériels et Méthodes

### 2.1. Produits

#### *Chrome-Cobalt*

De par leur excellente résistance à la corrosion en milieux biologiques, les alliages de chrome-cobalt (CrCo) (en particulier le Vitalium, le Wisil et le L605) sont utilisés de longue date dans la fabrication des dispositifs médicaux implantables. De plus, ils offrent des propriétés mécaniques intéressantes, notamment en ce qui concerne leurs résistances à la déformation et à l'élongation, ainsi qu'une bonne cytocompatibilité. Leurs densités élevées assurent également une bonne radio-opacité. Ce sont des alliages de choix pour la constitution de stents vasculaires, en particulier par rapport aux aciers précédemment employés. Dans ce travail, nous avons utilisé des pastilles de CrCo répondant à la norme ISO 5832-12 (Co 66.00%, Cr 27.34%, Mo 5.19%, Mn 0.56%, Si 0.39%, fournisseur Böhler-Edelstahl, Allemagne) pour les expérimentations *in-vitro* et des stents vasculaires en CrCo (Diamètre 2,25-2,75 mm, longueur 8-18mm, Multi-Link®, AbbotVascular, AbbottPark, IL) pour les expérimentations *in-vivo*.

#### *Dopamine*

La dopamine utilisée dans ce travail était fournie par Sigma Aldrich (SaintLouis, USA), avec un poids moléculaire (PM) de 189.64 g.mol<sup>-1</sup>.

### 2.2. Matériel et Méthodes

#### 2.2.1. *Fonctionnalisation de surface*

#### *Préparation des échantillons de CrCo*

A partir d'un tube plein en CrCo de 14.5 mm de diamètre (normes ISO 5832-12), des pastilles de 3 mm d'épaisseur étaient découpées à l'aide d'une tronçonneuse munie d'un disque 20S25 (Struers Inc., Strongsville, OH, USA) puis d'une micro-tronçonneuse munie d'un disque AO01043 (Presi Inc., Brié et Angonnes, France). Les pastilles obtenues étaient ensuite polies

mécaniquement (Polisseuse automatique PHOENIX 4000, (Buehler, Germany), avec des disques à épaisseurs de grain dégressives (600, 1200 puis 2400)). Une finition dite « miroir » était réalisée à l'aide d'un polissage ultime par un disque supra5 et une solution colloïdale de carbure de silicium (SPM 1/10  $\mu\text{m}$ ). Les échantillons obtenus étaient ensuite nettoyés dans des bains successifs d'acétone, d'éthanol, puis d'eau déionisée aux ultrasons. La surface efficace d'une pastille était considérée équivalente à  $1,54\text{cm}^2$ .

#### Oxydation de surface

L'oxydation du CrCo permet l'apport de fonctions hydroxyles en surface, qui assureront une accroche durable de la PDA sur la surface métallique par l'intermédiaire des catéchols (232). Le traitement dît « Piranha » a été décrit par Vetrone (233) pour l'oxydation de surface en titane (mélange 1:1 d'eau oxygénée ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (à 30%) et d'acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (à 96%)). Il a ensuite été repris, et adapté au traitement de surface en chrome-cobalt (234), puis ses paramètres ont été optimisés dans le cadre de travaux précédemment conduits au sein de notre laboratoire (235) pour donner le protocole suivant : Immersion des échantillons 60 heures dans une solution contenant 30% d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et 70% d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à température ambiante. Les échantillons étaient ensuite rincés aux ultrasons par 4 bains successifs de 30 minutes dans l'eau déionisée, afin d'éliminer les résidus, en particulier les sulfites.

#### Fonctionnalisation par polydopamine

Conformément au protocole utilisé dans notre laboratoire(235), chaque échantillon était plongé dans 5 mL de tampon Tris à 10mM, contenant 2mg/mL de dopamine, ajusté à pH 8.5, à l'abri de la lumière, à température ambiante et sous agitation (400 rotations par minute, rpm) pendant 12 heures. Les échantillons étaient ensuite rincés à l'eau déionisée afin

d'éliminer le surplus de dopamine non greffée, puis placés à 150°C pendant une heure. Ces échantillons sont dénommés ultérieurement dans le manuscrit CrCo-PDA.

Une variante de fonctionnalisation inspirée des travaux de Yang (193) était également utilisée, puisque c'est avec ce protocole de fonctionnalisation que les effets pro-cicatrisant *in-vitro* de la PDA ont été identifiés. Il consistait à immerger 3 fois les échantillons dans la solution de dopamine selon les mêmes conditions. Après chaque immersion, les échantillons étaient rincés aux ultrasons 3 fois 10 minutes dans de l'eau déionisée. Enfin, les échantillons étaient placés à 150°C pendant une heure. Ces échantillons sont dénommés ultérieurement dans le manuscrit CrCo-PDAm.

#### *Stérilisation*

Si nécessaire, la stérilisation des échantillons était réalisée par simple immersion dans un bain d'éthanol à 70% pendant une minute. Les échantillons étaient ensuite séchés sous hotte stérile avant utilisation.

#### *Caractérisation de surface*

Les analyses ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB) sur un microscope Hitachi S-4700 avec FEG (Field Emission Gun). Les échantillons étaient préparés par déposition d'un film de carbone, au moins deux heures avant acquisition des images. Les acquisitions étaient réalisées entre 1.5 et 5 kV, de face, et à 45° d'angulation. Une rayure était pratiquée en surface de l'échantillon par une aiguille fine afin d'apprécier l'épaisseur du revêtement.

### 2.2.2. Evaluation biologique *in-vitro*

#### Prolifération cellulaire

L'évaluation *in-vitro* de la cytocompatibilité du revêtement de PDA était réalisée conformément à la norme ISO 10993-5 avec des cultures primaires de cellules endothéliales vasculaires ombilicales humaines (HUVEC, Promocell, GmbH, Heidelberg, Allemagne) et de cellules musculaires lisses artérielles ombilicales humaines (HUASMC, Promocell, GmbH, Heidelberg, Allemagne). Les HUVEC étaient cultivées dans un milieu de croissance cellulaire pour cellules endothéliales (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne) enrichi avec un supplément de croissance cellulaire endothélialMix (Promocell, GmbH, Heidelberg, Allemagne) et de la gentamicine (40 µg/mL, Panpharma, Luitré, France). Les HUASMC étaient cultivées dans un milieu de croissance pour cellules musculaires lisses (Promocell GmbH, Heidelberg, Allemagne) enrichi avec un Smooth Muscle Cell Growth SupplementMix (Promocell, GmbH, Heidelberg, Allemagne) et de la gentamicine (40 µg/mL). Les cellules étaient cultivées à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (MCO-17AI, Sanyo, Osaka, Japon) avec 5% de CO<sub>2</sub> et un taux d'humidité relative de 100%.

Des disques de CrCo (Ø 14.5 mm) préalablement décrits, fonctionnalisés à la PDA (CoCr-PDA et CoCr-PDAm) étaient placés au fond de plaques de culture cellulaire de 24 puits (COSTAR®, Starlab) et 10 000 cellules dans 1 mL de milieu de culture étaientensemencées dans chaque puits. Un et 3 jours après l'ensemencement des cellules, la prolifération cellulaire était évaluée par une méthode non destructrice grâce au bleu alamar (UptiBlue™, Interchim), l'augmentation du métabolisme du bleu alamar étant un reflet de la prolifération cellulaire. Brièvement, le milieu de culture était retiré de chaque puit et remplacé par 500 µL de bleu alamar dilué. Après 3 h d'incubation, 150 µL de cette solution étaient transférés sur une plaque de 96 puits (Nunc®, Polylabo) pour mesure de la fluorescence (fluorimètre Twinkle

LB970TM (Berthold, France)) à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et à une longueur d'émission de 590 nm. Les données sur l'intensité de fluorescence étaient normalisées et exprimées en pourcentage moyen  $\pm$  écart-type par rapport au témoin (CoCr nu, 100 %). L'expérimentation était réalisée en triplicata.

#### Analyse du cytosquelette en microscopie confocale

L'étude du cytosquelette des différentes populations cellulaires sur les revêtements de PDA était réalisée en microscopie confocale après coloration des filaments d'actine. Après 1 et 3 jours de culture sur échantillons dans les conditions décrites ci-dessus, les cellules étaient fixées au paraformaldéhyde 2% à température ambiante, puis perméabilisées dans un tampon phosphate (PBS) et du Triton X-100 avant d'être bloquées dans du PBS à 1% de sérum albumine bovine (BSA). Les filaments d'actine étaient marqués avec 1,2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC)-phalloïdine et les noyaux étaient colorés à l'aide de 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) à 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Après rinçage au PBS, les échantillons étaient fixés dans un milieu de montage PBS-glycérol-DABCO, puis examinés au microscope confocal inversé à balayage laser LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Allemagne). Tous les réactifs utilisés pour cette expérience étaient fournis par Sigma-Aldrich, UK.

#### Test d'hémolyse

Des échantillons de sang étaient prélevés sur donneurs sains (après obtention du consentement) dans des tubes citraté BD Vacutainer® (Becton, Dickinson and Company). Les échantillons étaient pré-conditionnés dans 6mL de solution de chlorure de sodium à 0,9 % (p/v) pendant 30 minutes à 37°C. Le chlorure de sodium était utilisé comme témoin négatif et le carbonate de sodium,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , à 0,1 % comme témoin positif. Soixante  $\mu\text{L}$  de sang total étaient déposés sur les différents échantillons et incubés à 37°C pendant 60 minutes, sous agitation à 80 rpm. Les solutions étaient récupérées puis centrifugées pendant 10 minutes à

3250 rpm, à température ambiante. L'absorbance était mesurée à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques pour déterminer le taux d'hémoglobine libérée par les globules rouges lysés. L'expérimentation étaient conduites en triplicata.

Le taux d'hémolyse était calculé comme suit :  $R = (A-C1)/(C2-C1) \times 100\%$ , avec R : rapport d'hémolyse (%), A : absorbance de l'échantillon (optical density, OD), C1 : absorbance des témoins négatifs (OD), C2 : absorbance du témoin positif (OD).

#### Test d'adhésion plaquettaire

A partir de sang humain récupéré comme préalablement décrit, du plasma riche en plaquettes (PRP) était préparé par centrifugation (centrifugeur Allegra X12-R, Beckman Coulter, Fullerton, CA) à 300 G et 25°C pendant 5 minutes. Cent µL de PRP frais étaient ajoutés sur chaque échantillon et incubés pendant 45 minutes à 37°C. Les plaquettes non adhérentes étaient retirées en rinçant doucement l'échantillon deux fois avec une solution de NaCl à 0,9 %. La quantification des plaquettes adhérentes était déterminée en mesurant l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) avec un kit LDH (Roche Life Sciences, Meylan Cedex, France) selon les recommandations du fabricant. L'absorbance était mesurée à 490 nm pour chaque échantillon à l'aide d'un lecteur de microplaques. Une gamme-étalon de l'activité de la LDH était préparée à partir de concentrations plaquettaires connues pour estimer le nombre de plaquettes correspondant à la densité optique mesurée.

#### 2.2.3. Evaluation in-vivo

Toutes les expérimentations animales étaient réalisées conformément aux recommandations pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire(236) et à la réglementation du Ministère français de l'Agriculture, et ont été approuvées par le Comité local de soin et

d'utilisation des animaux en établissement (N° CEEA 212011). Toutes les interventions chirurgicales étaient effectuées par deux opérateurs entraînés.

#### Modèle animal et technique d'implantation des stents

Des rats Wistar mâles adultes (350-400 g, Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France) étaient achetés et nourris avec un régime normal pendant une semaine. Le jour de l'implantation, les rats étaient répartis au hasard en deux groupes (CoCr ou CrCo-PDA) de 10 rats dans chaque groupe. Les rats étaient anesthésiés par injection intrapéritonéale de kétamine à 130 mg/kg (Virbac, Carros, France) et de xylazine à 14 mg/kg (Dechra, Northwich, Royaume-Uni). L'aorte infra-rénale était exposée par laparotomie médiane et une héparinisation systémique (300 UI/kg) était effectuée par injection directe dans la veine cave inférieure avant le clampage aortique (Figure 2.2a). Les stents ( $\varnothing$  2,5 mm  $\times$  longueur  $12 \pm 4$  mm, vasculaire d'Abbott) étaient introduits par une aortotomie transversale, après avoir été ressertis sur leurs cathéters à ballonnet (figure 2.2b), puis dilatés à la pression nominale (8 atm) avec un surdimensionnement de 30% comparé à l'aorte native (figure 2.2b). La longueur des stents était répartie uniformément entre les groupes.

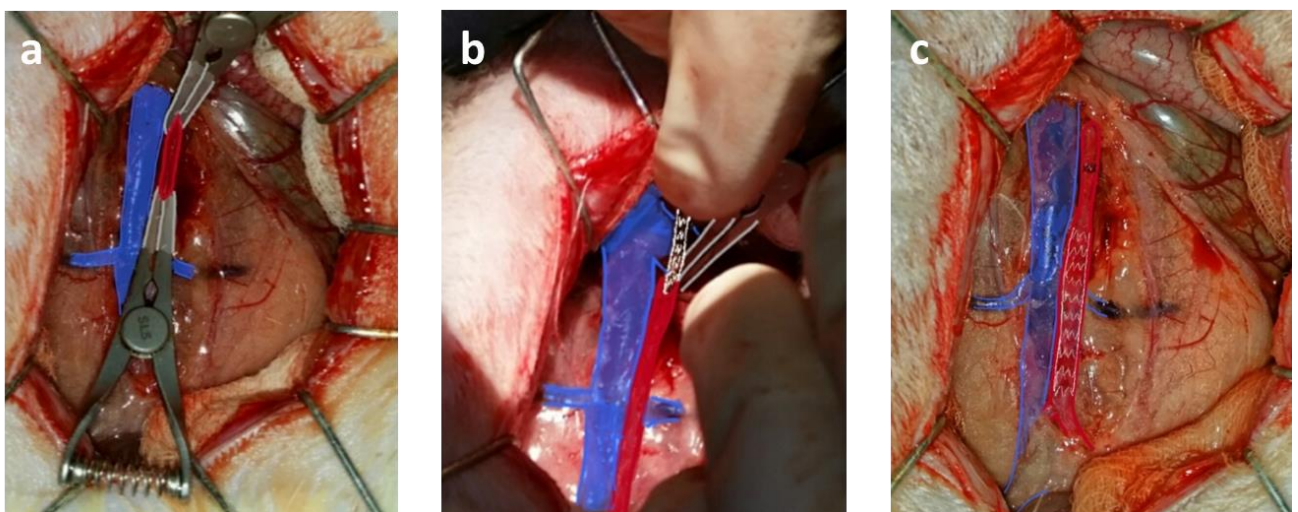


Figure 2.2: L'aorte est approchée par laparotomie médiane et clampée après héparinisation (injection dans la veine cave inférieure) (Figure 2.2a). Le stent, serti sur ballonnet, est introduit par une aortotomie transversale (Figure 2.2b), et déployé avec un oversizing de 30% (Figure 2.2c).



A 7 et 28 jours après l'implantation des stents, les animaux étaient anesthésiés ; après héparinisation, les animaux étaient sacrifiés par injection intraveineuse de T61 (MSD, Courbevoie, France).

Au 7e jour, les artères stentées étaient prélevées et congelées à -28°C pour l'analyse de l'expression des protéines chez 4 animaux de chaque groupe.

Au 28e jour, les artères stentées étaient prélevées chez les 6 animaux restant dans chaque groupe et incluses en résine pour analyse histomorphométrique (5 rats) et analyse au microscope électronique (TEM) (1 rat).

#### Analyses histomorphométriques

Les aortes stentées étaient fixées dans une solution de PBS et de paraformaldéhyde à 4%, déshydratées, incluses dans une résine de polyméthyl-méthacrylate (Technovit 9100 new, Heraeus, Allemagne) et conservées une semaine à -20°C. Des coupes de 60 µm d'épaisseur étaient réalisées le long des aortes incluses. Pour chaque échantillon, 15 à 25 coupes étaient sélectionnées au hasard sur la longueur stentée, puis colorées à l'hématoxyline/éosine (HE) et examinées au microscope optique (Leika DMIL, Allemagne) avec un grossissement de  $\times 10$ , numérisées et enregistrées avec une caméra vidéo (AxioCam ERc 5s, Carl Zeiss Microscopy, Allemagne). Le degré de resténose était évalué à partir du rapport des surfaces mesurées entre la néointima et la média (rapport n/m). Deux opérateurs indépendants, en aveugle, effectuaient les mesures à l'aide d'un algorithme de planimétrie microscopique numérique informatisé (ImageJ). Les résultats étaient exprimés sous forme de moyenne de toutes les sections par stent  $\pm$  écart-type.

#### Analyse de la réendothélialisation

Les aortes stentées étaient fixées dans une solution tampon de paraformaldéhyde à 4% et de phosphate de glutaraldéhyde à 1% (pH 7,2) avant d'être incluses dans une résine Epon (Epoxy embedding medium kit, Sigma Aldrich, Saint Louis, USA). Des coupes ultrafines (75 nm) étaient réalisées et teintes à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb avant d'être examinées au microscope électronique Jeon 1100 (Tokyo, Japon) équipé d'une caméra numérique Gatan pilotée par le logiciel Digital Micrograph (Gatan, Pleasanton, USA). Ces analyses permettaient d'évaluer la qualité de la réendothélialisation des mailles.

#### Western-Blots

Les voies de signalisation activées ou inhibées après l'implantation des stents étaient étudiées par Western blot sur les aortes stentées de rat congelées prélevées au 7e jours après implantation (pic de la réponse inflammatoire dans ce model). Les analyses portaient plus spécifiquement sur les voies d'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses médiée par les Phospho-Kinases AktSER et MAP-Kinase P42/44; et la voie d'inhibition de la prolifération médiée par la MAP-Kinase P38. Les anticorps étaient achetés chez Cell Signaling (Danvers, USA). Les segments aortiques stentés étaient placés dans un tampon de lyse et le stent était soigneusement retiré. Les tissus vasculaires étaient homogénéisés et centrifugés (10 000 G pendant 20 min à 4°C) pour obtenir le surnageant contenant les protéines. Pour chaque échantillon, la concentration en protéine était déterminée par la méthode BCA (dosage colorimétrique des protéines, basé sur l'acide bicinchonique). Vingt à 30 µg de protéines étaient séparés sur un gel d'électrophorèse (à 10% de dodécylsulfate-polyacrylamide de sodium), puis transférés sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes étaient bloquées avec du lait en poudre écrémé à 5 %, avant d'être incubées avec des anticorps anti-Phospho-Kinase AktSER (1 : 1000), anti-MAP-Kinase P38 (1 : 1000) ou anti-MAP-Kinase P42/44 (1 : 1000) pendant 16 h à 4°C avec agitation légère. Après rinçage, les

membranes étaient incubées avec des anticorps secondaires (IgG anti-lapin conjuguées à la peroxydase de raifort, 1:2000) pendant 1 h à 20°C. Pour permettre la détection par chimioluminescence, les membranes étaient traitées avec un réactif ECL pendant 1 min, puis exposées à un hyperfilm ECL (Western Lightning® Plus-ECL, PerkinElmer, France) pendant 1-2 min. La densité de bande de la protéine d'intérêt était quantifiée par le logiciel Multi Gauge V3.0 (FUJIFILM Graphic Systems France S.A.S., Bussy-Saint-Georges, France). Les résultats étaient exprimés sous forme de rapport de la forme active (phosphorylée) sur la forme totale.

#### Analyses statistiques

Les variables quantitatives étaient exprimées en moyenne avec écart-type (ET) ou en médiane avec interquartile. Les variables qualitatives étaient présentées en pourcentage et en valeur absolue. En ce qui concerne les variables continues, la comparaison de deux échantillons indépendants a été effectuée avec un test t de Student si la normalité était vérifiée, sinon avec un test de Mann-Whitney. La comparaison de plus de deux échantillons était effectuée avec un test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov compte-tenu des effectifs. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative. Toutes les analyses statistiques étaient effectuées avec le logiciel SPSS (SPSS Statistics pour Windows, version 20.0., IBM Corp., Armonk, NY).

### 3. Résultats

#### 3.1. Caractérisation de surface

L'analyse par MEB des surfaces fonctionnalisées de CrCo révélait des morphologies différentes entre les échantillons PDA et PDAm. En effet, les images de la couche PDAm montraient la présence d'une grande quantité d'agrégats sur la surface du CrCo. Cette couche semblait plus rugueuse que le PDA qui montraient des agrégats moins nombreux mais plus larges. De plus, l'épaisseur de la couche de PDAm estimée par le test de la rayure semblait plus importante (~100 nm) que pour le PDA (~50 nm) (Figure 2.3). Ces résultats sont en accord avec les résultats des travaux précédemment conduits au sein de notre laboratoire concernant le revêtement PDA sur les surfaces CrCo(235).

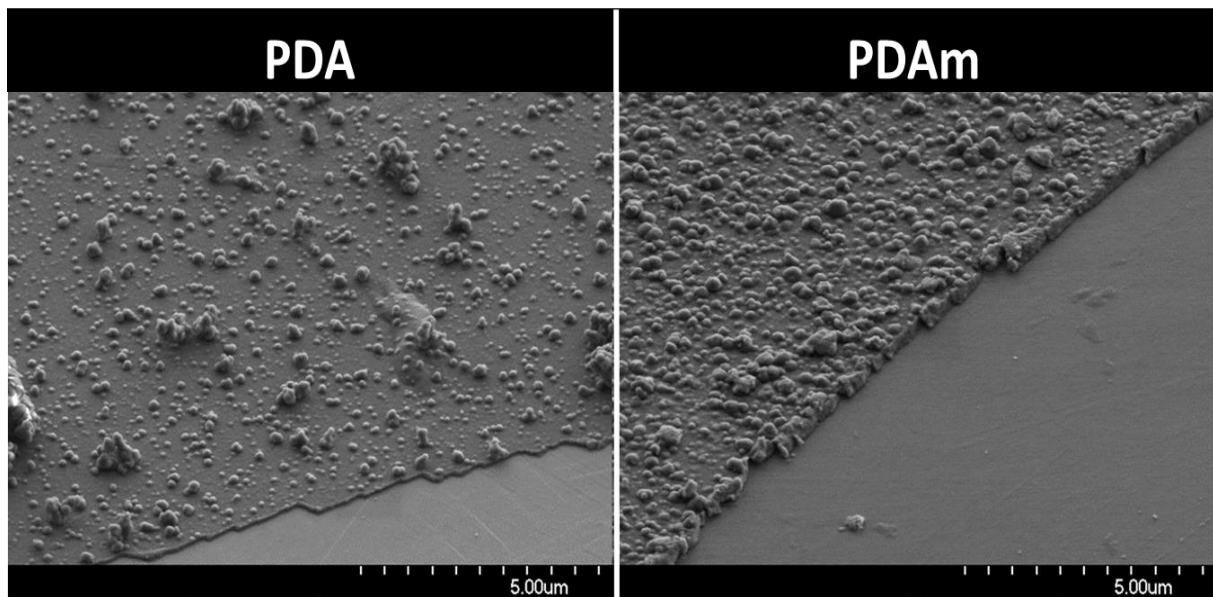


Figure 2.3: Aspect en MEB des surfaces enduites par la PDA et la PDAm.

#### 3.2. Expérimentations *in-vitro*

L'évaluation *in vitro* de la prolifération cellulaire sur les différents revêtements au 1<sup>er</sup> et 3<sup>e</sup> jours (Figure 2.4 A-B) révélait une augmentation de la vitalité des HUVEC sur les revêtements PDA et PDAm par rapport au CoCr nu ( $p < 0,05$ ). Aucune différence significative ( $p > 0,05$ ) n'était

observée entre les revêtements PDAm et PDA, sauf au premier jour où la vitalité cellulaire sur PDA était légèrement supérieure à celle sur PDAm. En revanche, au 1er et 3e jours (figure 2.4 C-D), la vitalité des HUASMC était significativement diminuées ( $p < 0,05$ ) sur les revêtements PDA et PDAm par rapport au CoCr nu, sans qu'aucune différence ( $p > 0,05$ ) ne soit observée entre les deux revêtements à base de PDA au 1er jour. Au 3e jour, on observait cependant une inhibition de la prolifération des HUASMC plus importante sur PDAm que sur PDA.

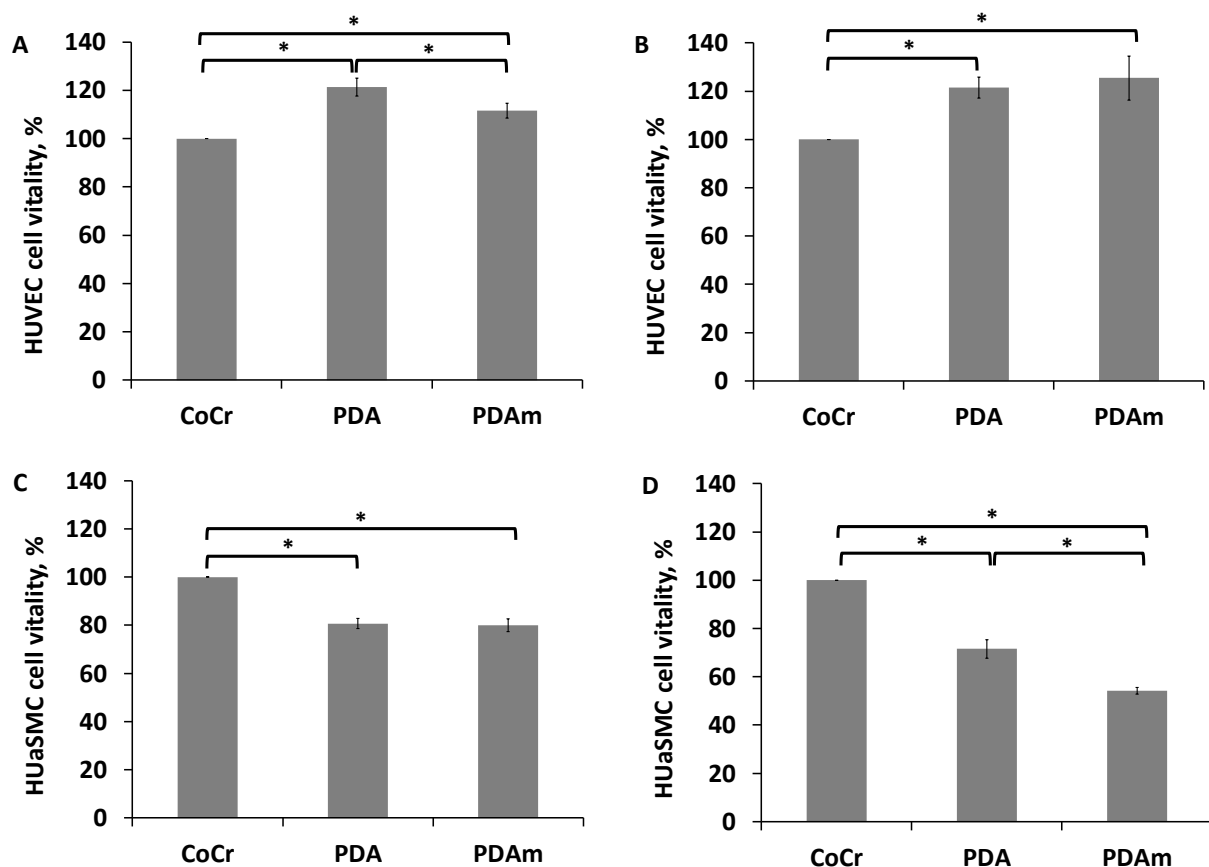


Figure 2.4: Vitalité cellulaire des populations HUVEC et HUaSMC aux 1er (A,C) et 3e jours (B,D) sur échantillons PDA et PDAm (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% RH), sans renouvellement du milieu de culture (n=6). \*, différence significative ( $p < 0.05$ ) entre les échantillons testés et le groupe contrôle (Cobalt-chrome, CoCr). HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell, HUaSMC: Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells.

Malgré les différences évoquées ci-dessus entre HUVEC et HUASMC, en microscopie confocale (Figure 2.5) les filaments d'actine étaient organisés en un réseau de longues fibres bien définies, couvrant l'ensemble du corps cellulaire, ce qui témoignait d'un bon fonctionnement du cytosquelette, et donc d'un bien-être des différentes populations cellulaires sur les différents échantillons.

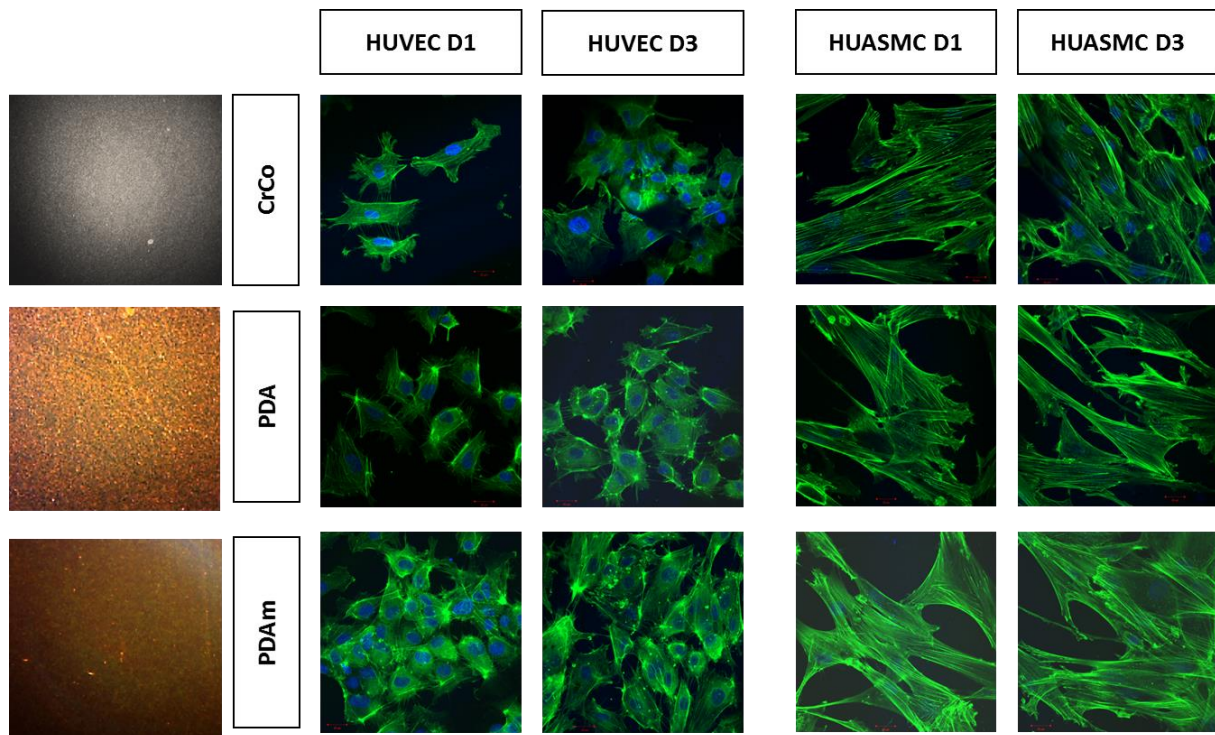


Figure 2.5: Aspect des lignées cellulaires HUVEC et HUASMC sur les différents supports par rapport au témoin (Chrome-cobalt nu) en microscopie confocale au 1er (D1) et 3e (D3) jours, avec marquage des filaments d'actine à la phalloïdine (vert), et des noyaux au dapi (bleu). HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell, HUASMC: Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cells.

Le test d'hémolyse montrait l'absence d'hémolyse pour tous les échantillons testés. Aucune différence entre le témoin négatif (NaCl) et les échantillons de disque (CrCo, PDA et PDAm) n'était observée (figure 2.6).

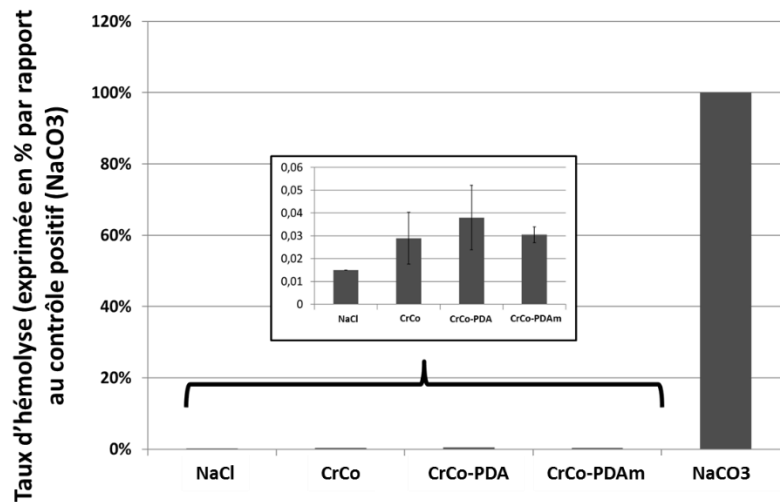


Figure 2.6: Le test d'hémolyse ne mettait pas en évidence de différence entre le témoin négatif (NaCl) et les différents échantillons testés, en comparaison au témoin positif (NaCO<sub>3</sub>).

Le taux d'adhérence plaquettaire (figure 2.7) sur les échantillons de CrCo était semblable à celui des échantillons enrobés de PDA ou de PDAm, même s'il semblait légèrement plus élevé sur PDA que sur PDAm ( $p > 0,05$ ).

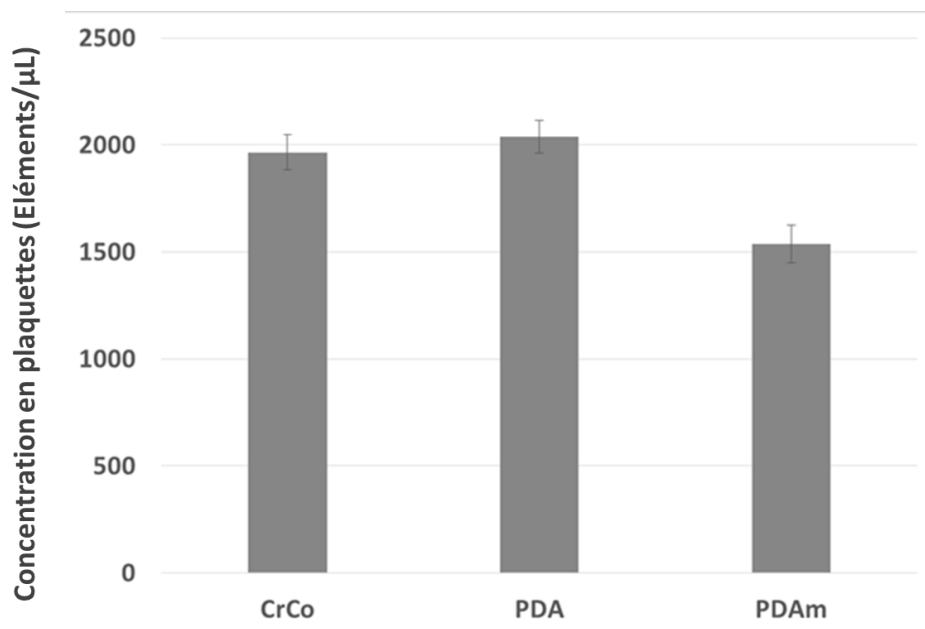


Figure 2.7: Test d'adhésion plaquettaire (évaluée par la quantité de LDH libérée par la lyse des plaquettes immobilisées sur les différents revêtements) entre les différents supports.

### 3.3. Evaluation *in-vivo*

Un rat dans chaque groupe décédait dans la période postopératoire. Par conséquent, les analyses histomorphométriques au 28e jours après l'implantation de stents n'étaient conduites que sur 4 (au lieu de 5) rats par groupe. Elles révélèrent une réduction significative ( $p < 0,001$ ) de la RIS après implantation d'un stent PDA (rapport n/m =  $0,48 \pm 0,26$ ) comparativement au CoCr (rapport n/m =  $0,83 \pm 0,42$ ) (figure 2.8).

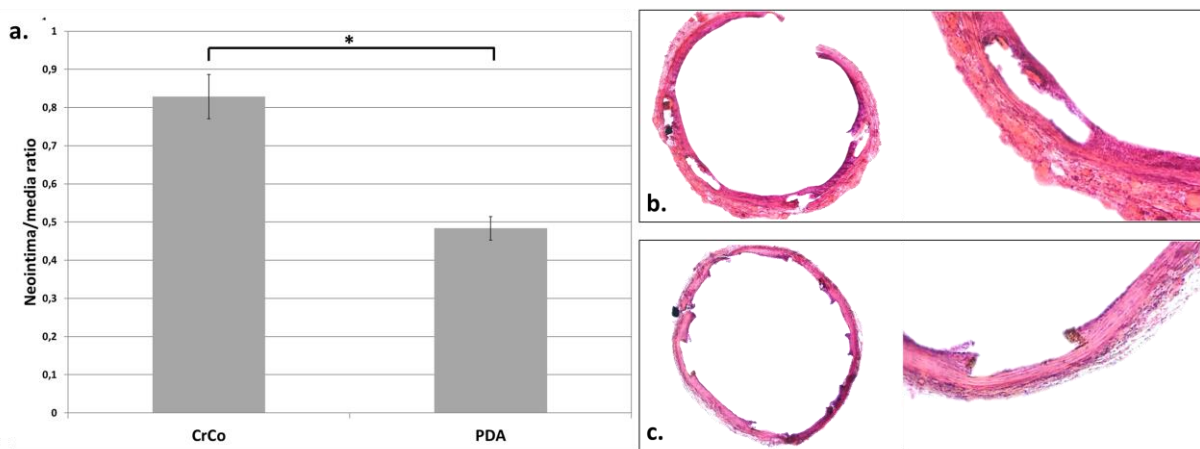


Figure 2.8: Evaluation de la resténose intra-stent, estimée par le rapport neointima/media, dans le groupe de rats PDA (ayant reçu des stents CrCo-PDA) par rapport au groupe contrôle (a). Aspect histologique typique d'une aorte au 28e jour après implantation d'un stent en Chrome-Cobalt nu (b) et en chrome-cobalt fonctionnalisé par un revêtement PDA (c).

L'analyse de la réendothélialisation TEM révélait une néointima plus mince recouvrant les mailles du stent dans le groupe PDA (figure 2.9b) comparativement au groupe CoCr (figure 2.9a), ce qui est conforme à l'analyse histologique ci-dessus. L'architecture des cellules faisant face à la lumière artérielle était similaire entre stents nus et stents fonctionnalisés à la PDA (Figure 2.9c-d), avec présence de cellules aplaties à jonctions serrées caractéristiques des cellules endothéliales.



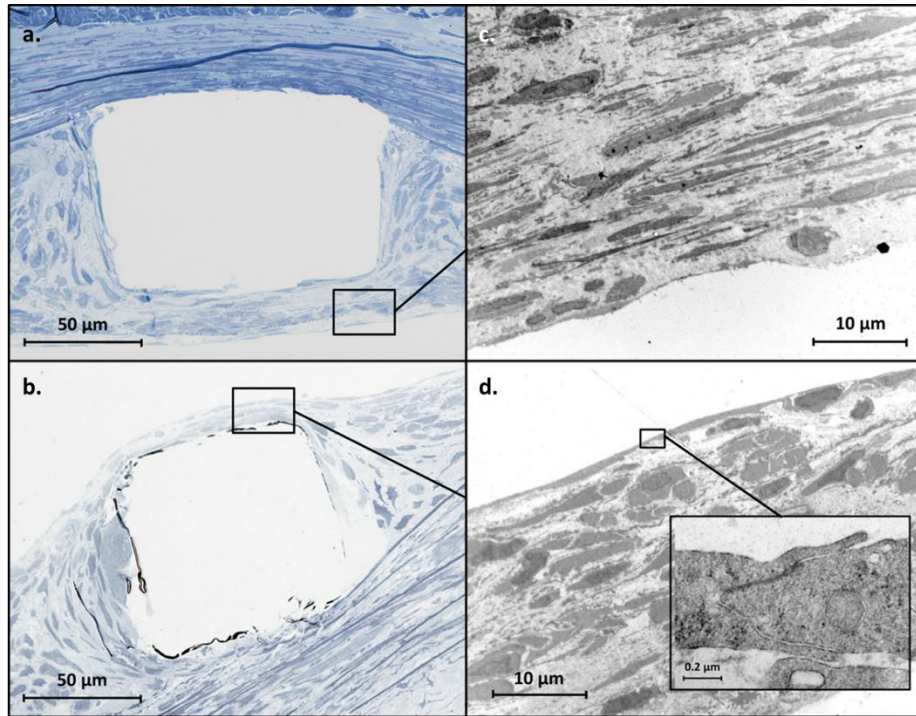


Figure 2.9: Analyse en Microscopie Electronique à transmission (MET) de la couverture de la maille entre les stents CrCo (a, c) et PDA (b,d) après implantation chez le rat.

Sur les analyses en Western-blot réalisées au 7<sup>e</sup> jour après l'implantation des stents, aucune différence n'était observée sur les voies d'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses, puisque les taux de formes activées d'Akt(SER) (figure 2.10 a) et p42/44 (figure 2.10b) sur leurs formes totales entre les groupes PDA et CoCr étaient similaires. Cependant, l'analyse de la voie d'inhibition de la prolifération des SMC vasculaires, médiée par la MAP-Kinase P38, démontrait une tendance non significative à une activation plus élevée avec les stents PDA qu'avec les stents nus (Figure 2.10c). Ces résultats suggèrent que la réduction observée sur la RIS en présence d'un revêtement PDA pourrait être liée à une inhibition de la prolifération des SMC par activation de la voie médiée par la MAP-Kinase p38.

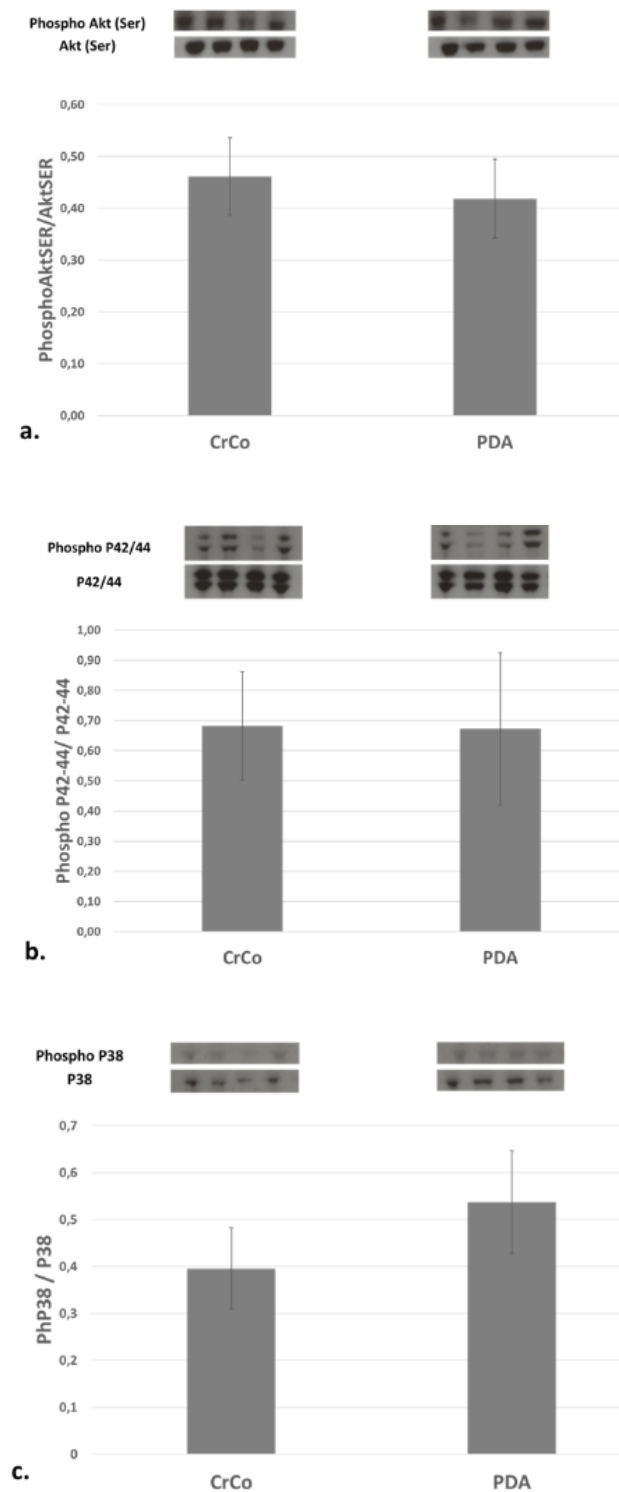


Figure 2.10 : Analyses en Western-blot des voies d'activation de la prolifération des cellules musculaires lisses (SMC), médiées par les phospho-kinases Akt(SER) (a) et p42/44 (b). Analyse de la voie d'inhibition de la prolifération des SMC médiée par la MAP-Kinase p38 (c).

## 4. Discussion

Les DES ont été développés pour pallier au principal problème rencontré suite à l'utilisation des stents nus : la resténose. Les premiers DES (Cypher et Taxus) ont révolutionné la cardiologie interventionnelle, mais ont montré leurs limites en termes de résultats cliniques avec les phénomènes de TAT. De nombreuses stratégies ont été élaborées pour améliorer les résultats des deuxième et troisième générations de DES. De manière générale, les DES donnent de meilleurs résultats que les BMS en termes de RIS. Toutefois, même si la 2ème génération de DES a partiellement surmonté les problèmes de TAT rencontrés avec la 1ère génération, la 3ème génération, elle, et en particulier les stents résorbables ou « polymer-free », n'a pas démontré sa supériorité par rapport au gold standard de la 2ème génération (CC-DP-EES). De plus, il n'existe toujours pas, à l'heure actuelle, de stents commercialisés proposant un principe actif visant à restaurer l'intégrité et le fonctionnement de la paroi vasculaire.

Yang et al(225) et Zhong et al(194) ont rapporté *in vitro* un effet pro-cicatrisant potentiel des surfaces de PDA, avec inhibition sélective du SMC et promotion de la prolifération des ECs. Dans ces études, les surfaces PDA sont obtenues par trois bains successifs de dopamine, avec une étape intermédiaire de sonification (eau désionisée), et une étape finale de séchage (une heure à 150°C). Les revêtements de surface obtenus par leur méthode sont généralement plus épais et plus rugueux que ceux obtenus par notre protocole standard consistant en une couche de PDA, comme nous avons pu le constater par MEB (Figure 2.3) (223). De plus, ces protocoles tendent à former de petits agrégats (237) en surface de la polydopamine attribués à des trimères cytotoxiques (DHI)<sub>2</sub>/PCA qui pourraient diminuer la cytocompatibilité. Notre hypothèse est qu'une seule couche de PDA est suffisante pour observer un effet pro-cicatrisant *in-vitro* et *in-vivo*, même si les surfaces semblent morphologiquement différentes.

Ainsi, parallèlement au protocole standard (PDA), nous avons reproduit le protocole précédemment publié par Yang et al(225) pour obtenir les trois couches de PDA (PDAm) et comparer *in-vitro* les potentiels de ces deux surfaces.

Comme précédemment décrit par Yang et al(225), Hee Ku et al(238) et Luo et al(239), le revêtement PDA semblait favoriser la prolifération EC *in-vitro* dans ce travail. Néanmoins, aucune différence significative en termes de prolifération des HUVEC au 3e jour n'était observée entre le PDA et le revêtement PDAm, ce qui confirme notre hypothèse selon laquelle une simple couche serait effectivement suffisante pour améliorer la prolifération des EC. Ainsi, comme le suggèrent Luo et al(239), les stimuli chimiques apportés par la couche de PDA sembleraient avoir plus d'impact sur la prolifération EC que la topologie de surface en elle-même (micro- ou nano-structurée). Parallèlement, l'inhibition de la prolifération des SMC était améliorée avec les échantillons de PDAm au 3e jour, par rapport à la PDA. Selon Ding et al(240), des modifications dans le procédé de synthèse du revêtement (essentiellement dans la concentration initiale de la solution en dopamine) induiraient un rapport différent entre les groupes quinone/catéchol exposés sur les surfaces de polydopamine. D'après les travaux menés par cette équipe, il semblerait qu'une plus grande concentration de groupe quinone augmenterait le taux d'absorption des protéines (en particulier de la fibronectine) et favoriserait ainsi la prolifération des EC en régulant leur adhérence. D'autre part, les groupes catéchol pourraient être impliqués dans l'inhibition des SMC par leurs propriétés antioxydantes. Par ailleurs, la réalisation d'un traitement thermique à 150°C après dépôt de la couche de PDA a montré une augmentation significative de la proportion de quinones(241), ainsi que du taux d'absorption des protéines et de la prolifération des cellules endothéliales *in-vitro*.

Wang et al.(231) ont proposé une méthode d'électropolymérisation de la dopamine (ePDA), qui permettrait d'obtenir des surfaces plus lisses. Ces revêtements ePDA posséderaient une cytocompatibilité et une reproductibilité accrues par rapport à la PDA, tout en conservant une forte réactivité pour les groupes amines. Cette technique pourrait être utilisée pour améliorer les résultats retrouvés dans ce travail.

L'hémocompatibilité est un problème majeur avec les dispositifs vasculaires. Les précédentes publications sur les revêtements de PDA et leurs impacts sur l'adhésion plaquettaire font état de résultats contradictoires. Ding et al. ont signalé un taux d'adhésion plaquettaire plus élevé sur les surfaces de titane revêtues de polydopamine(240), mais ils supposent que les fortes propriétés de d'absorption de la polydopamine envers les protéines non adhésives, comme la sérum-albumine entraîneraient une passivation de surface *in-vivo*. Yang et al.(225) ont de leur côté démontré que l'adhésion plaquettaire était significativement diminuées sur des échantillons d'acier 316L revêtus de polydopamine. Pour ces auteurs, même si l'absorption de fibrinogène était plus élevée sur les surfaces revêtues de PDA que sur métal nu (ce qui devrait induire des taux d'adhésion plus élevés), le fibrinogène absorbé sur la polydopamine était dénaturé et conduisait donc à une adhésion plaquettaire moindre. Dans notre étude, les revêtements PDAm (similaires à ceux utilisés par Yang et al.) ont montré une tendance à une diminution de l'adhésion plaquettaire, mais aucune différence n'a été observée entre les échantillons de CrCo nu et de PDA. Sur la base de ces résultats, on peut avancer qu'une couche simple de polydopamine, si elle ne diminue pas l'adhésion plaquettaire, n'altère au moins pas l'hémocompatibilité *in-vitro*. Par ailleurs, le taux d'hémolyse était négligeable entre les différents échantillons et ne différait pas de celui du groupe témoin (sérum salé).

Comme aucune différence majeure n'était observée *in-vitro* entre les revêtements PDA et PDAm, les études *in-vivo* étaient conduites uniquement selon le procédé standard de synthèse du revêtement de PDA de notre laboratoire, afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire aux expérimentations. Le ratio néointima/média était utilisé comme indicateur pour estimer la RIS. Au 28e jour après l'implantation des stents, la RIS était significativement plus faible avec les stents fonctionnalisés par une couche de polydopamine qu'avec les stents nus. De plus, l'analyse en TEM, effectuée pour évaluer la qualité de la réendothélialisation et de la couverture des mailles, montrait une monocouche de cellules avec des jonctions étroites du côté luminal évoquant des EC. Ces résultats suggèrent que l'effet pro-cicatrisant de la polydopamine évoqué par plusieurs études *in-vitro* serait maintenu *in-vivo* et pourrait être un atout en situation clinique.

Plusieurs cascades de signalisation cellulaires régulent la croissance des SMC, parmi lesquels on retrouve des membres de la famille des MAP-Kinases tels que p42/44 et p38, ou encore la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) et son effecteur d'aval Akt. La MAPK p42/44 semble jouer un rôle central dans la cascade de signalisation de la prolifération(242). Au contraire, p38 MAPK semble avoir des effets antiprolifératifs sur les SMC vasculaires(243). Les surfaces modifiées par PDA sont déjà connues pour améliorer l'adhésion, la prolifération et la migration des HUVEC, la libération d'oxyde nitrique (NO) (225) et diminuer l'adhésion et la prolifération des HUASMCs *in-vitro*. D'après les résultats de notre étude, il semble exister *in-vivo* une tendance à l'activation de la voie d'inhibition des SMC médiée par la MAPK p38 lorsque des stents PDA sont implantés, ce qui suggère un effet protecteur contre la resténose.

En plus de ses propriétés intrinsèques pro-cicatrisantes, la polydopamine présente une réactivité latente envers les nucléophiles tels que les amines et les thiols qui a été exploitée

pour le greffage d'agents thérapeutiques ou de polymères (199,241,244) sur la surface de stents afin de promouvoir une re-endothélisation ou réduire la RIS. La couche de polydopamine présente également quelques groupes amino réactifs, déjà utilisés au sein du laboratoire pour le greffage d'un polymère à base de cyclodextrine permettant la libération contrôlée de paclitaxel pour prévenir la RIS(235). Dans cette étude, nous avons évalué la densité des fonctions amines sur les couches PDA et PDAm pour d'autres applications. Il est intéressant de noter que les titrages colorimétriques des groupes amines sur les différentes surfaces ont révélé plus de fonctions NH<sub>2</sub> (amines) disponibles sur les surfaces PDA que sur les surfaces PDAm (respectivement 1,62 +/- 0,34 vs 0,73 +/- 0,1 µg/cm<sup>2</sup>, p = 0,1) (Figure 2.11) Ces fonctions pourraient être utilisées pour le greffage ultérieur de plus grandes quantités de molécules thérapeutiques offrant un effet pro-cicatrisant synergique avec la polydopamine, ouvrant la voie à de nouvelles perspectives dans le domaine cardio-vasculaire.

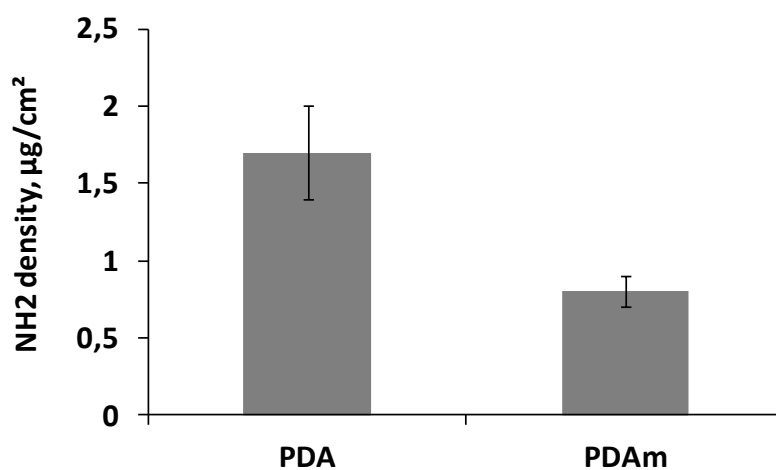


Figure 2.11: Titrations colorimétriques à l'acide orange II des groupes amines disponibles sur des surfaces de PDA et de PDAm (p=0,1).

## 5. Conclusion intermédiaire

Cette étude confirme l'effet pro-cicatrisant *in vitro* du revêtement de PDA par une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses et une amélioration de la prolifération des cellules endothéliales. Il est intéressant de noter que cet effet *in vitro* est conservé *in vivo* avec une réduction de la resténose après 28 jours d'implantation chez le rat. Ce polymère biocompatible de PDA pourrait donc jouer un rôle clé dans la prévention de la resténose in-stent et les nouvelles générations de DES.

De plus, la PDA a de nombreuses fonctions chimiques réactives dans sa structure (quinone, amines) qui pourraient être exploitées pour immobiliser des molécules thérapeutiques sur la surface du stent pour un effet synergique. Le greffage d'une molécule antiplaquettaire et/ou antithrombotique sur la surface d'un stent pourrait également être envisagée, notamment dans le cadre du développement d'une nouvelle gamme de stents actifs liés aux pathologies veineuses.





## CHAPITRE 3 : VERS UNE PLATEFORME VERSATILE

### 1. Introduction

Comme évoqué précédemment, la PDA possède une réactivité latente pour les molécules exprimant des fonctions amines ou thiols, ce qui permet par exemple d'immobiliser à sa surface des protéines via leur extrémité N-terminale(245,246). Elle exprime également des groupements amines de surface qui peuvent être utilisés pour immobiliser de manière covalente d'autres molécules, exprimant par exemple des fonctions carboxyliques, via des liens amides. C'est cette stratégie qui a été étudiée au sein de notre laboratoire dans les travaux de J. Sobocinski pour immobiliser une couche de polycyclodextrine (PCD) sur la PDA(235). Ces travaux suggèrent cependant que la quantité de fonctions amines disponible (environ 5nmoles/cm<sup>2</sup>) en surface de la PDA est faible, et ne permettrait de greffer directement (sans l'intermédiaire de la PCD) qu'une petite quantité de principe actif.

Pour pallier à ce problème, plusieurs stratégies ont été évoquées dans la littérature, soit en transformant ou en encapsulant le principe actif pour que la molécule ou le complexe formé(229) exprime des fonctions amines, soit en ajoutant une molécule riche en amine en phase de polymérisation (co-polymérisation)(247).

Nous avons émis l'hypothèse qu'il était possible d'enrichir la surface du polymère de PDA en fonctions amines libres via le greffage de molécules riches en amines. Dans cette section, l'efficacité de diverses molécules possédant de nombreuses fonctions amines pour enrichir la PDA en fonctions amines a donc été évaluée. Deux stratégies ont également été comparées, celle des « couches successives » ou la molécule riche en amines est ajoutée secondairement

sur une couche de PDA préalablement formée, et celle dite « one-pot », où cette molécule est ajoutée directement à la solution de dopamine pour participer à la polymérisation.

## 2. Produits, Matériels et Méthodes

### 2.1. Produits

#### 2.1.1. Polyéthylèneimine (PEI)

Il s'agit d'un polymère dont le squelette est composé d'un groupement amine et d'une chaîne aliphatique carbonée. La PEI (Figure 3) utilisée dans ce travail est linéaire (poids moléculaire, PM, compris entre 423 et 800 g/mol), ou ramifiée avec un poids moléculaire élevé, PM :  $\approx 25000$  g/mol, viscosité 13000- 18000cps,  $\leq 1\%$  d'impuretés (Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA).

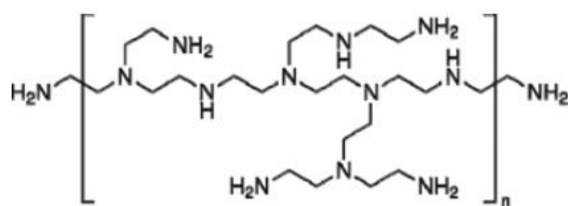


Figure 3.1a : Formule de la polyéthylèneimine ramifiée

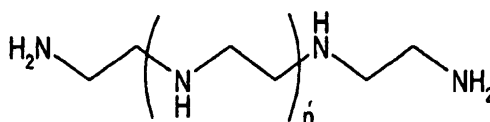


Figure 3.1b : Formule de polyéthylèneimine linéaire

#### 2.1.2. $bNH_2$ -PEG

Il s'agit d'un polyéthylène glycol linéaire présentant une fonction amine à chaque extrémité (O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylène glycol-block-polyéthylène glycol-block-polypropylène glycol), fourni par Sigma Aldrich, (Saint-Louis, USA PM: env. 600 g/mol, viscosité 72 cSt (20 °C), densité 1,035 g/mL).

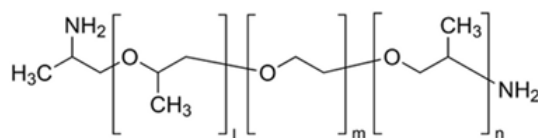


Figure 3.2: Formule de la bNH<sub>2</sub>.PEG

### 2.1.3. L-cystéine

Il s'agit d'un acide- $\alpha$ -aminé naturel qui possède un groupement amine ou thiol, fourni par Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA.

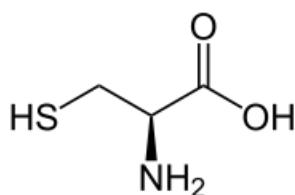


Figure 3.3: Formule de la L-cystéine

## 2.2. Matériel et Méthodes

### Préparation des échantillons

Des pastilles de CrCo étaient préparées selon le protocole mentionné Chapitre 2. Conformément au protocole d'oxydation préalablement décrit, elles étaient immergées 60 heures dans une solution contenant 30% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et 70% d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, puis rincées aux ultrasons par 4 bains successifs de 30 minutes dans l'eau déionisée.

Deux procédés de fonctionnalisation étaient ensuite utilisés :

Stratégie des « couches successives » : La première étape consistait en une fonctionnalisation à la PDA selon le protocole préalablement rapporté (immersion 12 heures dans une solution à 2mg/mL de dopamine, ajusté à pH 8,5, rinçage et recuit 1 heure à 150°C). Les échantillons étaient ensuite immergés 12 heures dans différentes solutions de donneurs d'amines. Ces

solutions étaient préparées à partir d'un tampon Tris 10 mM (121mg/100 mL) dans lequel était ajouté 25g/L pour la L-cystéine et 50g/L pour les différentes PEI ou pour le bNH<sub>2</sub>-PEG. Le pH des solutions de L-cystéine et de bNH<sub>2</sub>-PEG était ajusté à 8,5 avec HCl 1M (sous hotte). Le pH des solutions de PEI était ajusté à 8,5 à l'aide d'HCl 12M (sous hotte).

Stratégie « one-pot » ou stratégie de copolymérisation : Après préparation des pastilles selon le protocole « piranha » et rinçage, les échantillons étaient directement immergés dans des solutions de dopamine auxquelles étaient ajoutés les donneurs d'amines. En pratique, on ajoutait 2mg/mL de dopamine à des solutions préparées à partir d'un tampon Tris 10 mM (121mg/100 mL) dans lesquelles étaient ajoutés 25g/L de L-cystéine, ou 50g/L pour les différentes PEI ou pour le bNH<sub>2</sub>-PEG. Le pH était ajusté à 8,5 pour toutes les solutions. Le temps d'immersion des échantillons dans les différentes solutions était de 36 heures, en partant de l'hypothèse que la présence d'une autre molécule pouvait ralentir la réaction de polymérisation de la dopamine.

Dans les deux stratégies, les échantillons étaient ensuite rincés par immersion simple dans un tampon Tris et séchés à l'étuve, à l'abri de la lumière.

#### *Dosage des fonctions amines*

Le dosage des fonctions amines disponibles en surface était réalisé par quantification colorimétrique selon le test de l'Acide orange II (AOII). En pratique, chaque échantillon était immergé dans 20 ml d'une solution d'AOII à  $2,5 \cdot 10^{-2}$  M, ajustée à pH 3 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1 M, durant 2 heures, sous agitation (80rpm) et à température ambiante. L'AOII non complexé au substrat était éliminé à l'aide de 2 rinçages successifs par immersion dans 20 ml d'eau acidifiée (pH 3) pendant 20 min sous agitation (80 rpm). La désorption de l'AOII complexé au substrat était réalisée par immersion de la pastille dans 2 ml

d'eau à pH=12, pendant 12h sous agitation (80 rpm) à température ambiante. Chaque solution était ajustée à pH=3 à l'aide d'HCl 0,1 M pour un dosage UV à 485 nm (248) avec un spectromètre UV-Vis (UV-1800, Shimadzu). Pour chaque groupe, les échantillons étaient préparés en triplicata.

#### *Caractérisation de surface*

##### *Analyse de la construction en Résonance Plasmonique de surface (SPR)*

La SPR est une technique mesurant l'indice de réfraction d'un faisceau lumineux sur une surface métallique. Cet indice de réfraction varie lorsqu'on immobilise une molécule sur la surface métallique et peut donc être utilisé comme témoin du dépôt d'une couche de polymère par exemple. L'or est ici utilisé en remplacement du CrCo car sa surface est riche en électrons libres, ce qui augmente la résonance du faisceau incident et donc l'intensité du faisceau réfléchi détecté.

Des pastilles d'or étaient fonctionnalisées par un revêtement de PDA (immersion dans la solution de dopamine réduite à 1h afin d'obtenir une fine couche de PDA non opaque) (249). Une solution tampon était utilisée (PBS 10mM, pH7,4) pour irriguer les échantillons. Après stabilisation du signal, 50µL de solution tampon contenant de la PEI étaient injectés sur la surface et le signal était enregistré pendant 15 minutes. Par la suite, un rinçage par 2 fois 500µL de solution tampon de PBS était effectué, suivi d'un enregistrement du signal pendant 3 minutes. Les manipulations ont été réalisées à l'aide d'un système SPR Springle Autolab (Eco Chemie, Pays-Bas).

##### *Angle de goutte*

La mouillabilité des échantillons était déterminée à partir de la mesure de l'angle de contact. Trois gouttes distinctes d'eau ultra-pure étaient placées sur la surface de chaque disque (CrCo, CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI) et l'angle de contact était mesuré à l'aide d'une caméra

numérique(250). Les images numériques étaient acquises avec le logiciel DIGIDROP (Contact angle meter, GBX scientific instruments, France). Les mesures étaient réalisées en triplicata.

#### *Cytocompatibilité*

La cytotocompatibilité était évaluée à l'aide d'une lignée de cellules endothéliales HPMEC (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells). Le milieu de culture utilisé était de type ECGM MV (Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) enrichi en facteurs de croissance (Endothelial Cell Growth SupplementMix, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany), en streptomycine (0,1 g/l) et pénicilline (100 IU/ml). Les cultures étaient réalisées à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (CB 150/APT line/Binder, LabExchange, Paris, France) réglé à 5% de CO<sub>2</sub> pour 95% d'atmosphère et un pourcentage d'humidité à 100%. Les analyses étaient réalisées en triplicata dans des puits distincts pour chaque groupe (CrCo, CrCo-PDA, CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hemine).

Après avoir stérilisé les différents échantillons dans l'alcool pur pendant 1 minute, les pastilles étaient séchées à l'étuve à 37°C. Dans une plaque 24 puits (Costar®, Starlab), on déposait un échantillon par puits. Les puits libres correspondaient au témoin de prolifération « Tissue Culture PolyStyrène » (TCPS). Un volume de 0,9 mL de milieu était déposé dans chaque puits. Un volume de 0,1 mL correspondant à 7000 cellules était déposé délicatement au centre du puits goutte à goutte. La plaque reposait pendant 4 minutes afin que les cellules adhèrent au support puis elle était déposée délicatement à l'étuve à 37 °C pendant 3 ou 6 jours au terme desquels le milieu était retiré et les cellules rincées par une solution de NaCl (0,9%*m/V*).

#### *Test de viabilité cellulaire au bleu Alamar*

Le test de vitalité cellulaire était effectué directement sur les cellulesensemencées. Aux 3<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour, le milieu était remplacé par 0,5 mL de milieu de culture contenant du bleu Alamar (10

%). Les cellules étaient entreposées à 37°C, 2 heures, à l'abri de la lumière. Puis 150 µL étaient transférés dans une plaque 96 puits à fond noir (Nunc, Polylabo) en duplicata. La fluorescence était mesurée à l'aide d'un fluorimètre à 590 nm (Multiskan FC®, Thermo Scientific). Deux puits étaient utilisés pour effectuer le blanc avec 150 µL de la solution de bleu Alamar à 10 %. Les résultats étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin (CrCo nu).

#### *Test de prolifération cellulaire*

Le milieu de culture à 10% de bleu alamar était retiré des puits. Les cellules étaient ensuite traitées par 300 µL de trypsine (0,05%*m/V*) pendant 10 minutes à 37°C. Le volume de 300 µL était récupéré dans un pot non stérile (acuvette), puis le puits était rincé à l'aide de 7,7 mL d'une solution de NaCl (0,9%). Le comptage était effectué par un détecteur de particules Coulter Z1 (Coulter Electronics) sur un volume prélevé de 0,5 µL, détectant toutes les particules ayant un diamètre supérieur à 9 µm. Les résultats étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin (CrCo nu).

#### *Analyses statistiques*

Les variables quantitatives étaient exprimées en moyenne avec écart-type (ET) ou en médiane avec interquartile. Les variables qualitatives étaient présentées en pourcentage et en valeur absolue. En ce qui concerne les variables continues, la comparaison de deux échantillons indépendants a été effectuée avec un test t de Student si la normalité était vérifiée, sinon avec un test de Mann-Whitney. La comparaison de plus de deux échantillons était effectuée avec un test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov compte-tenu des effectifs. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative. Toutes les analyses statistiques étaient effectuées avec le logiciel SPSS (SPSS Statistics pour Windows, version 20.0., IBM Corp., Armonk, NY).



### 3. Résultats

#### 3.1. Choix du donneur d'amines et de la stratégie d'enrichissement

Le test à l'AO II confirmait la présence d'environ 5nmoles/cm<sup>2</sup> d'AO II sur les pastilles fonctionnalisées au PDA selon la méthode traditionnelle. Avec la méthode des couches successives, l'ajout de L-Cystéine permettait de doubler les fonctions amines disponibles (11,7±1,5 nmoles/cm<sup>2</sup>). L'utilisation de bNH<sub>2</sub>-PEG ou de PEI linéaire de PM 423 ou 800 g/mol donnaient des résultats similaires (respectivement 23,0±5,9; 29,8±3,5 et 28,3±4,6 nmoles/cm<sup>2</sup>). La PEI ramifiée donnait les meilleurs résultats avec une concentration moyenne de 37,1±5,1 nmoles/cm<sup>2</sup> (Figure 3.4).

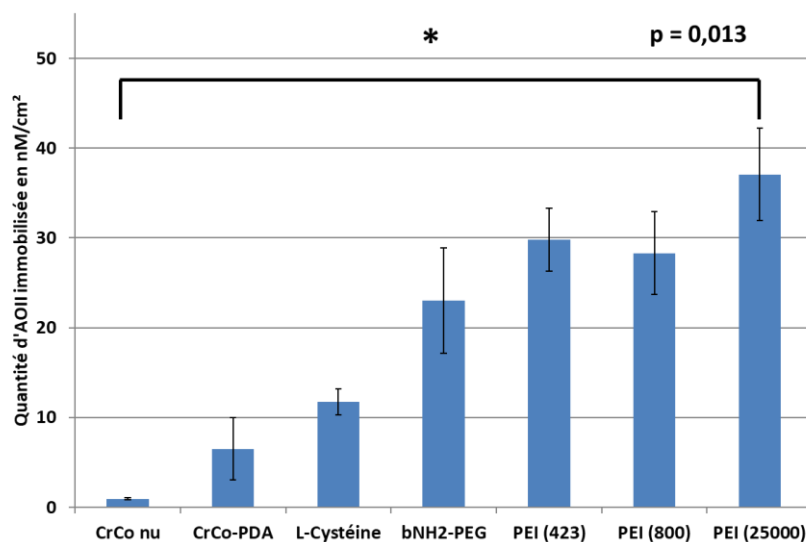


Figure 3.4: Histogramme représentant la quantité d'AOII immobilisée en nmoles/cm<sup>2</sup> sur les différents donneurs d'amines en technique « couches successives ». CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, bNH<sub>2</sub>-PEG : polyéthylène glycol diamine, PEI : Polyéthylènimine.

La technique « one-pot » ne permettait pas d'obtenir de résultats pertinents, en dehors de la copolymérisation dopamine/bNH<sub>2</sub>-PEG qui permettait de tripler la quantité de fonctions amines en surface, mais avec une grande variabilité (16,6±5,9 nmoles/cm<sup>2</sup>, p=0,013 par rapport à la PDA seule) (Figure 3.5).

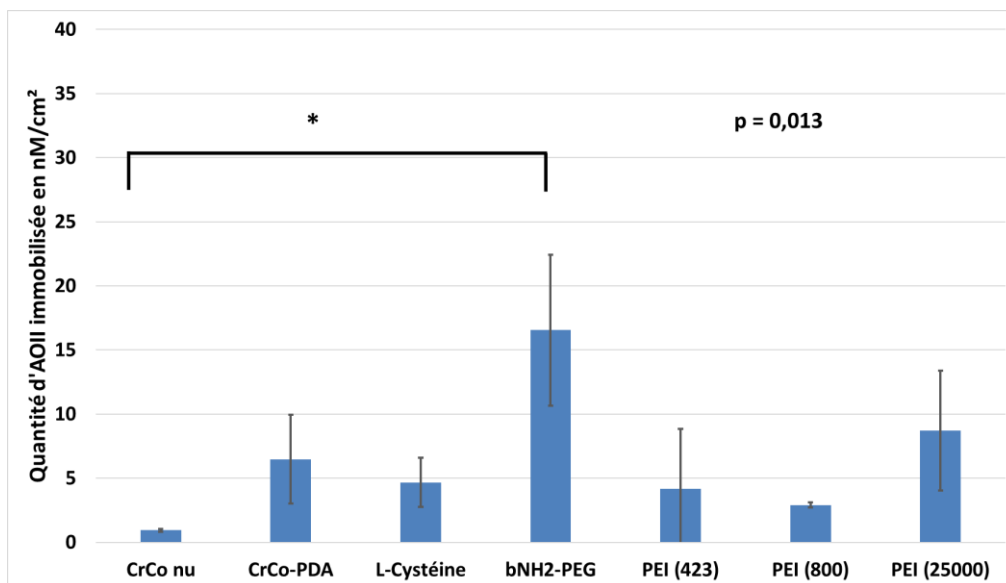


Figure 3.5: Histogramme représentant la quantité d'AOII immobilisée en nmoles/cm<sup>2</sup> sur les différents donneurs d'amines en technique « one pot ». CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, bNH<sub>2</sub>-PEG : polyéthylène glycol diamine, PEI : Polyéthylèneimine.

Sur la base de ces résultats, la suite des expérimentations de cette section était réalisée en ajoutant des fonctions amines par une couche additionnelle de PEI ramifiée (PM 25000 g/mol).

### 3.2. Caractérisation de surface

#### *Analyse SPR*

L'analyse en SPR permettait de confirmer le greffage de la PEI sur les supports CrCo-PDA-PEI (Figure 3.6). En effet, l'ajout de PEI sur une surface métallique (Au) sans PDA (Figure 3.6A) conduisait à une augmentation du signal SPR (flèche noire) mais celui-ci revenait à la ligne de base après rinçage (R), démontrant l'absence de greffage de la PEI à la surface métallique nue. En revanche, le rinçage n'entraînait qu'une faible diminution du signal sur la surface enduite de PDA, témoignant d'un greffage de la PEI à la surface enduite de PDA (Figure 3.6B).

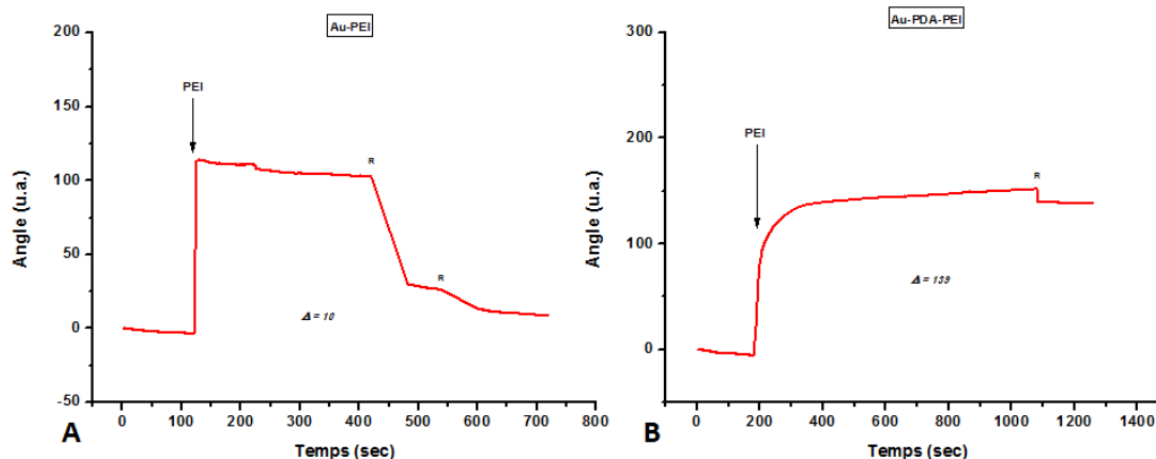


Figure 3.6 : Sensorgrammes SPR enregistrés lors d’injection de PEI sur une surface d’or nue (A) ou fonctionnalisée par PDA (B). Les flèches correspondent au temps d’injection des échantillons et « R » au temps de rinçage. Au : Or, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, SPR : surface plasmon resonance.

#### Angle de goutte

L’impact des processus de fonctionnalisation sur la mouillabilité des surfaces de CoCr était étudié grâce à des mesures statiques de l’angle de contact avec l’eau. Comme le montre la figure 3.7, la surface de CoCr présente un angle de contact de  $75,1 \pm 1,2^\circ$  (251). Cette surface devenait plus hydrophile après modification avec de la polydopamine ( $66,7 \pm 2^\circ$ ,  $p < 0,001$ ), probablement grâce au greffage des fonctions catéchols et quinones(252). Cette valeur diminuait encore à  $55,5 \pm 2,5^\circ$  ( $p < 0,001$ ) après la fonctionnalisation avec la PEI, ce qui témoignait de l’ajout des groupes amines hydrophiles à la surface du CoCr.

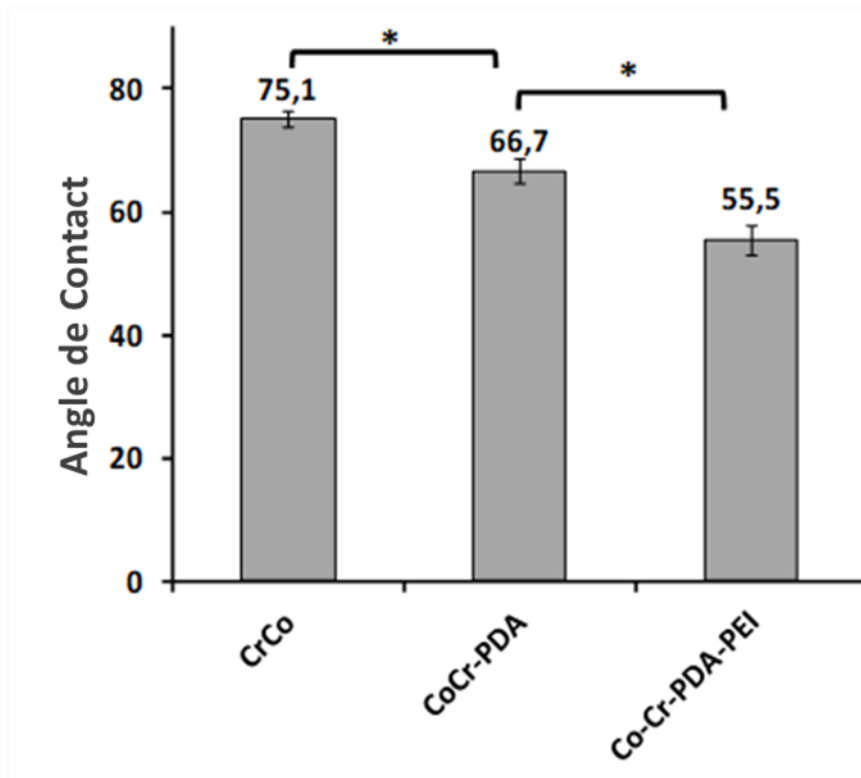


Figure 3.7: Evolution des mesures de l'angle de contact de l'eau tout au long des processus de fonctionnalisation (\*  $p < 0,001$ ). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine.

### 3.3. Cytocompatibilité

Les tests de cytocompatibilité (conduits avec des lignées cellulaires HPMEC) ne mettaient pas en évidence de différences significatives sur la prolifération ou la vitalité cellulaire à J3 entre les échantillons CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI (Figure 3.8). En revanche, la prolifération semblait moins bonne, et la vitalité réduite, sur les échantillons CrCo-PDA que sur les échantillons CrCo-PDA-PEI à J6.

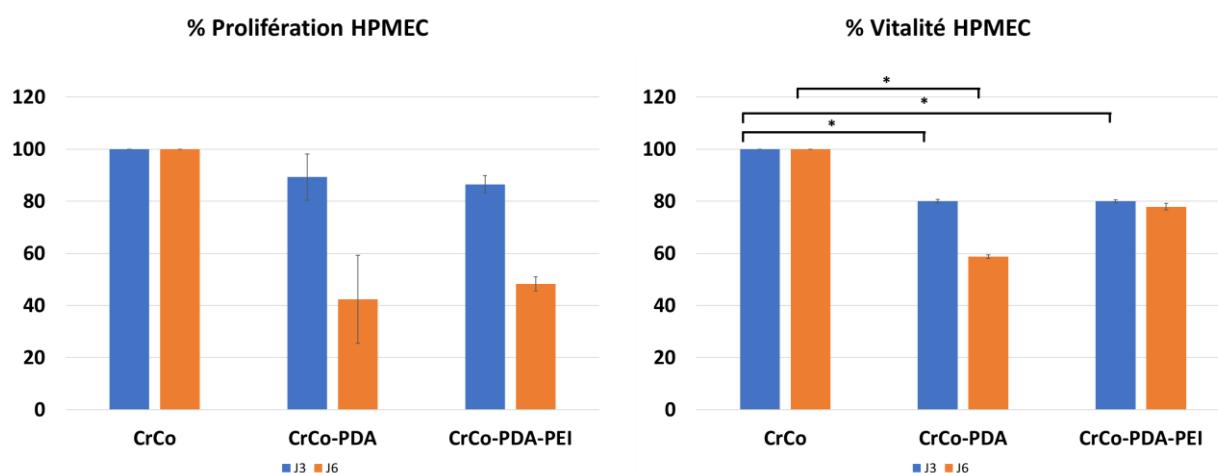


Figure 3.8 : Prolifération et vitalité des HPMEC sur les différents supports par rapports au CrCo nu. On ne retrouvait pas de différence significative en termes de prolifération à J3 ( $p=0,058$ ) ou J6 ( $p=0,059$ ). La vitalité cellulaire était significativement diminuée sur les supports fonctionnalisés, sans toutefois identifier de différence entre eux (J3, CrCo vs CrCo-PDA,  $p=0,007$ , CrCo vs CrCo-PDA-PEI,  $p=0,011$  ; J6, CrCo vs CrCo-PDA,  $p<0,01$ ). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells.

#### 4. Discussion

La présence d'une concentration conséquente de fonctions amines en surface de la PDA est un enjeu important dans l'optique d'immobiliser un principe actif via une liaison amide. Dans les travaux réalisés préalablement au sein du laboratoire par Sobocinski et al.(235), l'impact du traitement thermique de la couche de PDA sur l'expression de fonctions amines en surface avait été étudié par la méthode de l'AOII. Il avait été montré qu'après traitement thermique 1 heure à 150°C de la couche de PDA, la quantité de fonctions amines en surface était divisée par 4. En pratique, il semblerait que le traitement thermique entraîne une réticulation de la PDA avec consommation des fonctions amines et formation de dérivés indoles(239). Ceci n'avait pas altéré le greffage de la PCD, qui en polymérisant formait une couche uniforme sur la surface de PDA, mais s'est révélé problématique lors des tentatives initiales d'immobilisation de l'hémine (travaux de Master 2 d'A. Hertault, non présentés). Toujours

dans les travaux réalisés par Sobocinski et al.(235), l'importance de ce traitement thermique avait été démontré puisque les échantillons sans recuits montraient une dégradation rapide de la couche de PDA après immersion dans le PBS, contrairement aux échantillons avec traitement thermique dont la couche semblait encore visuellement intacte après 6 jours. De plus, il semblerait que ce traitement thermique favorise *in-vitro* la cytocompatibilité et la croissance des cellules endothéliales(239). Au vu de ces éléments, nous avons choisi d'élaborer une stratégie permettant d'enrichir la surface en fonctions amines, plutôt que d'éliminer l'étape de traitement thermique.

Dans la littérature, plusieurs stratégies de co-déposition de la dopamine avec une autre molécule riche en amines ont été proposées(247). Parmi ces stratégies, on retrouve l'ajout de polyéthylène polyamine pour la création de membranes séparant eaux/huiles(253), de poly(2-méthyl-2-oxazoline) hydrolysée pour des surfaces anti-fouling(254), d'acides aminés pour la régénération osseuse(244) ou encore d'un composé de poly(éthylène imine)(PEI)-Poly(éthylène glycol)(PEG) pour la culture cellulaire(255). Yang et al. ont également proposé la synthèse d'un polymère de dopamine riche en fonction amines par l'ajout d'une diamine, l'hexaméthylènediamine (256). Partant de ces résultats, nous avons identifié la L-cystéine, acide aminé présentant à la fois une fonction amine et une fonction thiol pouvant tous les deux interagir avec la dopamine, le bNH<sub>2</sub>-PEG, molécule diamine présentant des caractéristiques proches de l'hexaméthylènediamine mais plus simple à manier, et différentes poly(éthylène imine)s comme molécules d'intérêt.

Liu et al. ont proposé une stratégie de copolymérisation directe entre des catéchols et la PEI pour créer un polymère mimant la PDA(257). Nous avons tenté d'appliquer cette stratégie avec une copolymérisation de dopamine et de différentes PEI, mais les différents coatings

obtenus ne démontraient pas d'enrichissement significatif en fonctions amines. De plus, dans les travaux de Liu et al. (257), le revêtement obtenu ne semblait pas favoriser la prolifération des cellules endothéliales (HUVEC) comparativement à l'acier nu, et ne démontrait donc pas l'effet pro-cicatrisant identifié avec la PDA.

Les autres stratégies de co-polymérisation (figure 3.5) ne permettait pas non plus d'enrichir de manière significative la couche de PDA en fonction amines, en dehors de celle utilisant le bNH<sub>2</sub>-PEG. La quantification à l'AO II retrouvait une concentration en amines de 16,6±5,9 nmoles/cm<sup>2</sup>, ce qui n'a malheureusement pas pu être comparé aux résultats obtenus par Yang et al.(256) avec l'hexaméthylènediamine, la concentration en fonctions amines sur les surfaces n'ayant pas été évaluée dans cette publication. L'ajout d'une couche de molécules riches en amines s'avérait être dans ce travail une stratégie bien plus intéressante (Figure 3.4) avec l'obtention d'une surface significativement plus riche en amines avec l'utilisation de PEI ramifiée (concentration moyenne de 37,1±5,1 nmoles/cm<sup>2</sup>). Nous avons donc retenu cette stratégie pour la suite de nos travaux.

Les tests de mouillabilité par mesure de l'angle de goutte témoignaient d'une surface plus hydrophile (angle de goutte à 55,5° pour les surfaces CrCo-PDA-PEI versus 66,7° pour CrCo-PDA, p<0,01). Ceci peut être interprété comme un élément indirect confirmant l'enrichissement en fonctions amines de la surface, ces groupes fonctionnels étant connus pour augmenter l'hydrophilie et la biocompatibilité(258).

Les tests de cytocompatibilité conduits dans ce travail avec des lignées HPMEC retrouvaient des résultats similaires en termes de prolifération et de vitalité cellulaire entre les surfaces CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI, ce qui suggèrent que cette étape supplémentaire n'altérait pas la biocompatibilité du revêtement. On remarquait cependant que l'effet pro-cicatrisant des

surfaces de PDA confirmé *in vitro* au Chapitre 2 avec des cultures primaires d'HUVEC n'était pas retrouvé avec les HPMEC. Ces différences s'expliquent probablement en partie par une perte du phénotype endothélial dans la lignée HPMEC, avec perte des capacités de synthèse du monoxyde d'azote et de prostaglandine I2. Ces caractéristiques sont conservées dans la culture primaire de cellules HUVEC, et seraient impliquées dans l'effet pro-cicatrisant de la PDA (193).

Dans les travaux réalisés dans le cadre du master de N. Bricout au sein de notre laboratoire (travaux en cours de publication), la prolifération et la vitalité des lignées primaires d'HUVEC semblaient diminuer sur les supports CrCo-PDA-PEI (Figure 3.9 A-B). Li et al.(259) ont également observé une diminution de la prolifération des HUVEC sur une surface modifiée avec un copolymère PDA/PEI, ce qui pourrait être dû à des groupes amines trop abondants sur les surfaces obtenus selon les auteurs. Cette explication est discutable, dans la mesure où la plupart des auteurs s'accordent à penser que l'enrichissement de surface en fonctions amines augmente généralement l'adhésion cellulaire et la cytocompatibilité(256). La PEI est d'ailleurs régulièrement utilisée pour enduire les fonds des puits de culture cellulaire. Quoiqu'il en soit, ces résultats sous-entendent que l'ajout de PEI pourrait entraîner une altération des propriétés pro-cicatrisantes de la PDA *in-vitro*, mais ceci doit encore être confirmé par des expérimentations dédiées, notamment en évaluant l'impact de ce traitement de surface sur le comportement des SMC (avec une culture primaire d'HUASMC).



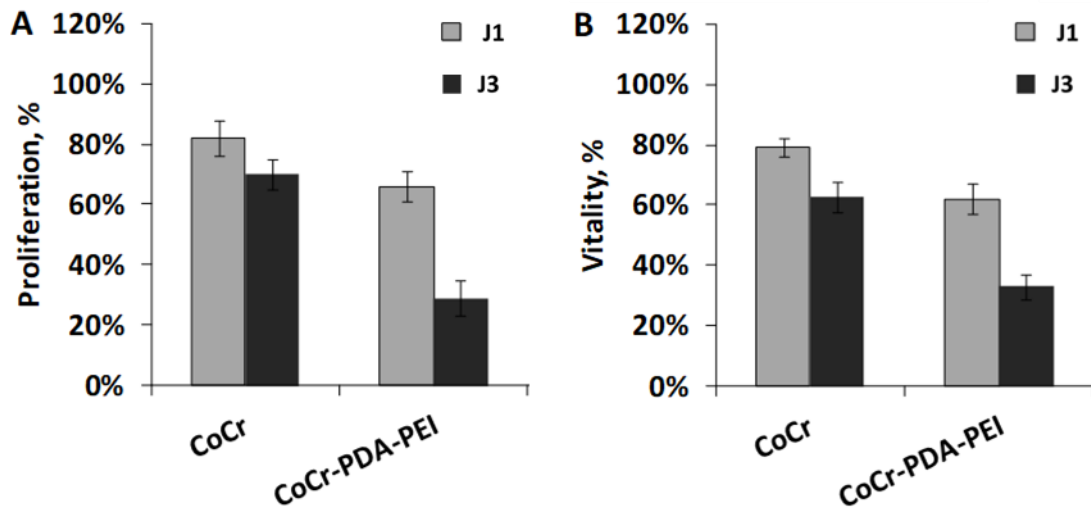


Figure 3.9: Prolifération (A) et viabilité au bleu Alamar(B) de lignées HUVEC sur CrCo et CrCo-PDA-PEI à J1 et J3 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% d'humidité relative), sans renouvellement du milieu de culture. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylènimine, HUVEC : Human umbilical vein endothelial cell.

## 5. Conclusion intermédiaire

L'ajout d'une couche de PEI ramifiée (25000 kD) sur la PDA est une méthode efficace pour enrichir la surface en fonction amines. Cette méthode permet également d'augmenter le caractère hydrophile des surfaces, ce qui théoriquement augmente leur biocompatibilité et diminue leur thrombogénicité. L'ajout de PEI ne semble pas altérer la cytocompatibilité des surfaces *in-vitro*, mais d'autres travaux conduits au sein de notre laboratoire suggèrent que cette étape pourrait altérer l'effet pro-cicatrisant intrinsèque à la PEI, en limitant la prolifération et la vitalité des cellules endothéliales. Cette hypothèse devra être testée dans des expérimentations dédiées.



## CHAPITRE 4: UN STENT PRO-CICATRISANT A L'HEMINE

### 1. Introduction

Dans le cadre des travaux de Thèse d'Université de Blandine Maurel, il a été démontré que chez le rat stenté en position aortique, l'injection intrapéritonéale d'hémine permettait une réduction significative de la RIS avec une réendothélialisation de la maille(210) via une activation de l'hème-oxygénase I (HO-1), en comparaison au placebo. En effet, l'hémine est un activateur et substrat de l'HO-1, par laquelle elle est dégradée en monoxyde de carbone (CO) endogène, hème et biliverdine. Le CO est un gaz vasodilatateur, connu pour inhiber la prolifération des SMC(260). L'hème et la biliverdine agissent eux comme anti-oxydants(261,262). Elle stimulerait également la production de monoxyde d'azote (NO) via l'activation de la synthase de NO endothéliale (eNOS), ce qui favoriserait la prolifération des cellules endothéliales(263).

L'hémine semble donc démontrer un effet pro-cicatrisant par administration systémique(210,263). Cependant, l'administration d'hémine chez l'homme n'est possible que par voie intraveineuse lente, avec des concentrations élevées et un risque majeur d'hépatotoxicité. Le but de cette section est de développer une stratégie permettant l'administration locale d'hémine via un stent, tout en contrôlant la cinétique de libération pour couvrir les pics de réponse inflammatoire et de prolifération myo-intimale à l'origine de la RIS.

L'hémine possède par ailleurs une autorisation de mise sur le marché (AMM) comme thérapeutique intraveineuse dans le traitement des crises de porphyrie aigüe sous l'appellation Normosang® (Il s'agit d'un arginate d'hémine pour assurer la solubilité à pH physiologique).

Les fonctions acides carboxyliques présentes sur l'hémine n'interviennent pas dans la reconnaissance de la molécule par l'HO-1 et peuvent donc être utilisées pour immobiliser la molécule sur une surface(264). Plusieurs stratégies ont été évaluées pour immobiliser l'hémine sur une surface en CrCo en amont de ce travail dans le cadre de mon Master 2 (non présentées). Au final, nous avons fait le choix d'immobiliser l'hémine sur les surfaces CrCo-PDA-PEI préalablement décrites, par la création d'un lien amide entre les fonctions amines exprimées sur la surface du revêtement, et les groupes carboxyliques de l'hémine.

## 2. Produits, Matériels et Méthodes

### 2.1. Produits

#### L'hémine

L'hémine est une protoporphyrine IX ferrique (Figure 4.1). Il s'agit d'un produit dérivé du sang. Elle est pratiquement insoluble dans la plupart des solvants, aqueux ou organiques, sauf en remplaçant l'ion chlorure présent sur le fer par un hydroxyde en conditions basiques. La molécule obtenue est traditionnellement appelée hématine (265).

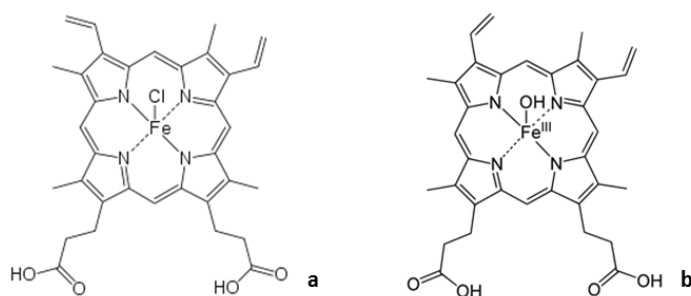


Figure 4.1 : Hémine chlorure (a) et Hématine (b)

Pour ce travail, nous avons utilisé l'hémine-chlorure d'origine bovine ((Sigma Aldrich, Saint-Louis, USA), pureté  $\geq 90\%$ , PM: 651.94 g/mol).

## 2.2. Matériel et Méthodes

### 2.2.1. Préparation des échantillons

Les échantillons (pastilles ou stents en CrCo) étaient préparés selon la méthode exposée au Chapitre 3. Une fois le stade CrCo-PDA atteint, on préparait une solution à 1mg/mL d'hémine dans une fiole de 100mL avec un tampon PBS 50mM à pH 12. L'hémine n'étant solubilisée qu'à pH basique, pH auquel la création spontanée de liens amides est peu probable, des agents de couplage étaient utilisés pour optimiser la réaction. Ainsi, on ajoutait à cette solution 100mg de carbodiimide (EDC) et 50mg de N-Hydroxysuccinimide (NHS), puis le pH était ajusté à 8 à l'aide d'HCl molaire. Les échantillons CrCo-PDA-PEI étaient immergés 12 heures dans 5mL de la solution obtenue, à 4°C, sous agitation (400rpm) à l'abri de la lumière. Les échantillons obtenus (CrCo-PDA-PEI-Hémine) étaient rincés au PBS 50mM et séchés à l'étuve à 37°C.

Les différentes étapes de fonctionnalisation permettant d'aboutir à la plateforme CrCo-PDA-PEI-Hémine sont représentées Figure 4.2.

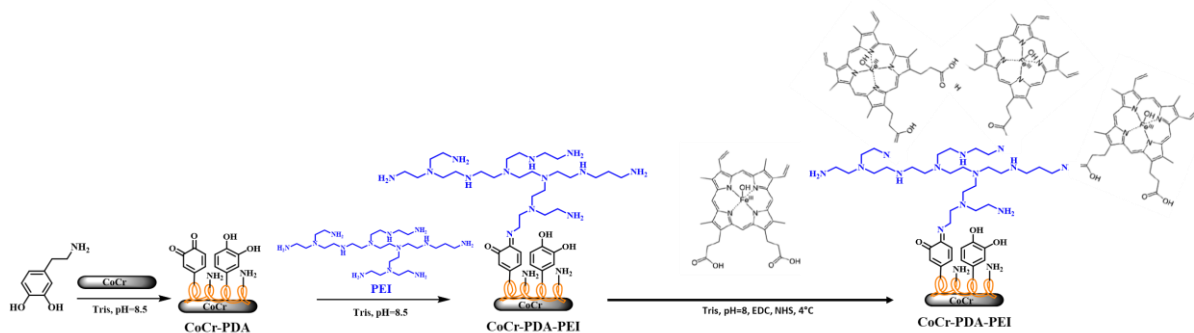


Figure 4.2 : Représentation des différentes étapes de fonctionnalisation permettant d'aboutir au greffage de l'hémine sur le CrCo. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, EDC : Carbodiimide, NHS : N-Hydroxysuccinimide.

### 2.2.2. Validation de l'immobilisation d'hémine

#### *Test au Luminol*

Le test au Luminol est fréquemment utilisé en médecine légale pour rechercher des traces de sang invisibles à l'œil nu, grâce à une réaction chimique entre le fer de l'hémoglobine et le luminol, responsable d'une fluorescence bleue marquée en présence d'eau oxygénée. L'hémine présentant une structure similaire à l'hème de l'hémoglobine, avec un atome de fer en son centre, il est théoriquement possible d'observer une réaction équivalente. Les échantillons fonctionnalisés avec de l'hémine étaient donc brièvement immergés dans une solution contenant du luminol et de l'eau oxygénée (50:50). L'observation d'une fluorescence bleue permettait de confirmer la présence d'hémine en surface du revêtement.

#### *Validation indirecte par dosage colorimétrique des fonctions amines libres*

Le dosage des fonctions amines disponibles en surface était réalisé par quantification colorimétrique selon le test de l'Acide orange II (AOII). En pratique, chaque échantillon était immergé dans 20 ml d'une solution d'AOII à  $2,5 \cdot 10^{-2}$  M, ajustée à pH 3 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 1 M, durant 2 heures, sous agitation (80rpm) et à température ambiante. L'AOII non complexé au substrat était éliminé à l'aide de 2 rinçages successifs par immersion dans 20 ml d'eau acidifiée (pH 3) pendant 20 min sous agitation (80 rpm). La désorption de l'AOII complexé au substrat était réalisée par immersion de la pastille dans 2 ml d'eau à pH=12, pendant 12h sous agitation (80 rpm) à température ambiante. Chaque solution était ajustée à pH=3 à l'aide d'HCl 0.1 M pour un dosage UV à 485 nm (248) avec un spectromètre UV-Vis (UV-1800, Shimadzu). Pour chaque groupe, les échantillons étaient préparés en triplicata.

L'objectif de cette expérimentation était de démontrer la saturation des fonctions amines sur le revêtement CrCo-PDA-PEI-Hémine comparativement aux surfaces CrCo-PDA-PEI.

#### *MEB-EDS (Energy Dispersive X-ray Spectroscopy - Spectroscopie à rayons X à dispersion d'énergie)*

Les analyses ont été réalisées par microscopie électronique à balayage (MEB) sur un microscope Hitachi S-4700 avec FEG (Field Emission Gun). Les échantillons étaient préparés par dépôt d'un film de carbone, au moins deux heures avant acquisition des images. Les acquisitions étaient réalisées entre 1.5 et 5 kV, de face, et à 45° d'angulation. Le spectre EDS permettait de déterminer la composition atomique en surface des échantillons.

#### *Spectrométrie Photoélectronique X – XPS*

La caractérisation de surface par spectroscopie photoélectronique aux rayons X (XPS) était conduite sur un appareil PHI 5000 VersaProbe Scanning ESCA Microprobe (ULVAC-PHI, Japon/USA) à une pression de base inférieure de  $5 \times 10^{-9}$  mbar. Les spectres étaient acquis à une énergie de passage de 23,5 eV et une valeur de pas de 0,1 eV. Tous les spectres étaient acquis avec un angle de 90° entre la source de rayons X et l'analyseur et avec l'utilisation d'électrons de faible énergie et d'ions argon de faible énergie pour la neutralisation des charges. L'analyse XPS permettait de rechercher l'apparition de l'atome de fer de l'hémine sur les échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine, en comparaison aux autres échantillons.

#### *Analyse en TOF-SIMS*

Une caractérisation de surface en TOF-SIMS était conduite. Elle permettait d'objectiver l'apparition de l'atome de fer de l'hémine sur les échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine, en comparaison aux autres échantillons.

Les données du ToF-SIMS ont été acquises à l'aide d'un instrument ToF-SIMS5 (ION-TOF GmbH, Allemagne) équipé d'un canon à ions bismuths métalliques liquides. Des jeux d'images hyperspectrales étaient acquis pour l'ensemble du spectre et pour chaque pixel. Pour cela, on utilisait du Bi<sup>3+</sup> avec une énergie ionique primaire de 25 keV, 0,25 pA. Les effets de charge dus au faisceau d'ions primaires étaient compensés au moyen d'un canon à électrons pulsés à basse énergie (20 eV). Les échantillons étaient analysés sur des surfaces de 500 × 500 μm<sup>2</sup>.



La dose totale du faisceau d'ions primaires pour chaque zone analysée était maintenue en dessous de  $10^{12}$  ions  $\text{cm}^{-2}$ , afin d'assurer des conditions statiques.

### 2.2.3. Quantification de l'hémine greffée

#### *Par Méthode ELISA*

Deux échantillons CrCo-PDA et deux échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine étaient préparés. La quantification était réalisée après désorption complète des revêtements par immersion des échantillons 120 heures dans 1 mL de PBS 10mM à pH 12, à 37°C sous agitation à 80 rpm. Les dosages ELISA étaient réalisés selon les recommandations du kit Abcam® (HeminAssay Kit ab65332). Ils reposaient sur la détection par un anticorps des produits de dégradation de l'hémine par une peroxydase. Ils fournissent une réponse semi-quantitative, mais aussi qualitative (puisque l'hémine doit être biodisponible pour pouvoir être dégradée), sur l'activité thérapeutique *in-vitro*. Schématiquement, une gamme-étalon, dont les concentrations allaient de 0 à 200 fmol d'hémine par puits, était préparée. Dans une plaque 96 puits, on déposait 50 $\mu$ L d'échantillon (issu des désorptions complètes) par puits, avant d'ajouter la peroxydase, puis l'anticorps et le niveau était complété jusqu'à 100 $\mu$ L par un tampon. Après 60 minutes d'incubation, les lectures étaient réalisées à 570nm sur un lecteur ELISA (Multiskan FC®, Thermo Scientific).

### 2.2.4. Expérimentations *in-vitro* - Cytocompatibilité

La cytocompatibilité était évaluée à l'aide d'une lignée de cellules endothéliales HPMEC (Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells). Le milieu de culture utilisé était de type ECGM MV (Endothelial Cell Growth Medium MV, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) enrichi en facteurs de croissance (Endothelial Cell Growth SupplementMix, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany), en streptomycine (0,1 g/l) et pénicilline (100 IU/ml). Les cultures étaient réalisées à 37°C dans un incubateur à CO<sub>2</sub> (CB 150/APT line/Binder, LabExchange,

Paris, France) réglé à 5% de CO<sub>2</sub> pour 95% d'atmosphère et un pourcentage d'humidité à 100%. Les analyses étaient réalisées en triplicata dans des puits distincts pour chaque groupe (CrCo, CrCo-PDA, CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hemine).

Après avoir stérilisé les différents échantillons dans l'alcool pur pendant 1 minute, les pastilles étaient séchées à l'étuve à 37°C. Dans une plaque 24 puits (Costar®, Starlab), on déposait un échantillon par puits. Un volume de 0,9 mL de milieu était déposé dans chaque puit. Un volume de 0,1 mL correspondant à 7000 cellules était déposé délicatement au centre du puits goutte à goutte. La plaque reposait pendant 4 minutes afin que les cellules adhèrent au support puis elle était déposée délicatement à l'étuve à 37 °C pendant 3 ou 6 jours au terme desquels le milieu était retiré et les cellules rincées par une solution de NaCl (0,9%*m/V*).

#### *Test de viabilité cellulaire au bleu Alamar*

Le test de vitalité cellulaire était effectué directement sur les cellulesensemencées. Aux 3e ou 6e jours, le milieu était remplacé par 0,5 mL de milieu de culture contenant du bleu Alamar (10 %). Les cellules étaient entreposées à 37°C, 2 heures, à l'abri de la lumière. Puis 150 µL étaient transférés dans une plaque 96 puits à fond noir (Nunc, Polylabo) en dupliqua. La fluorescence était mesurée à l'aide d'un fluorimètre à 590 nm (Multiskan FC®, Thermo Scientific). Deux puits étaient utilisés pour effectuer le blanc avec 150 µL de la solution de bleu Alamar à 10 %. Les résultats étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin (CrConu).

#### *Test de prolifération cellulaire*

Le milieu de culture à 10% de bleu alamar était retiré des puits. Les cellules étaient ensuite traitées par 300 µL de trypsine (0,05%*m/V*) pendant 10 minutes à 37°C. Le volume de 300 µL était récupéré dans un pot non stérile (acuvette), puis le puits était rincé à l'aide de 7,7 mL d'une solution de NaCl (0,9%). Le comptage était effectué par un détecteur de particules

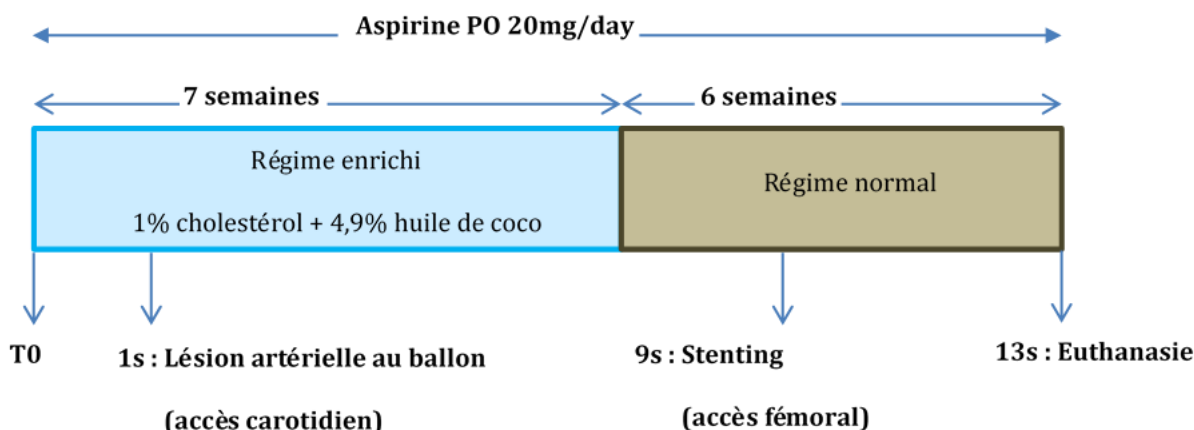
Coulter Z1 (Coulter Electronics) sur un volume prélevé de 0,5 µL, détectant toutes les particules ayant un diamètre supérieur à 9 µm. Les résultats étaient exprimés en pourcentage par rapport au témoin (CrCo nu).

#### 2.2.5. Expérimentations *in-vivo*

Toutes les expérimentations animales étaient réalisées conformément aux recommandations pour le soin et l'utilisation des animaux de laboratoire(236) et à la réglementation du Ministère français de l'Agriculture, et ont été approuvées par le Comité local de soin et d'utilisation des animaux en établissement (N° CEEA 212011). Toutes les interventions chirurgicales étaient effectuées par deux opérateurs entraînés.

#### *Analyses histomorphologiques – Modèle de lapin hypercholestérolémique*

Des lapins blancs Néo-Zélandais adultes mâles, d'environ 3-3,5kg (SEGAV, St Mars-D'Egrenne, France) étaient utilisés. Après une semaine d'acclimatation (cage individuelle, pièce dédiée à température et lumière contrôlée) et une alimentation standard, les lapins bénéficiaient d'une alimentation enrichie en cholestérol à 1% et en huile de noix de coco à 4,9% pendant 7 semaines, puis à nouveau d'un régime normal pendant 6 semaines (SSNIFF, Soest, Allemagne). Pendant les 13 semaines de protocoles, un traitement par Kardegic 20 mg/jour était administré aux animaux par l'intermédiaire de l'eau de boisson. L'alimentation et l'eau était données ad libitum.

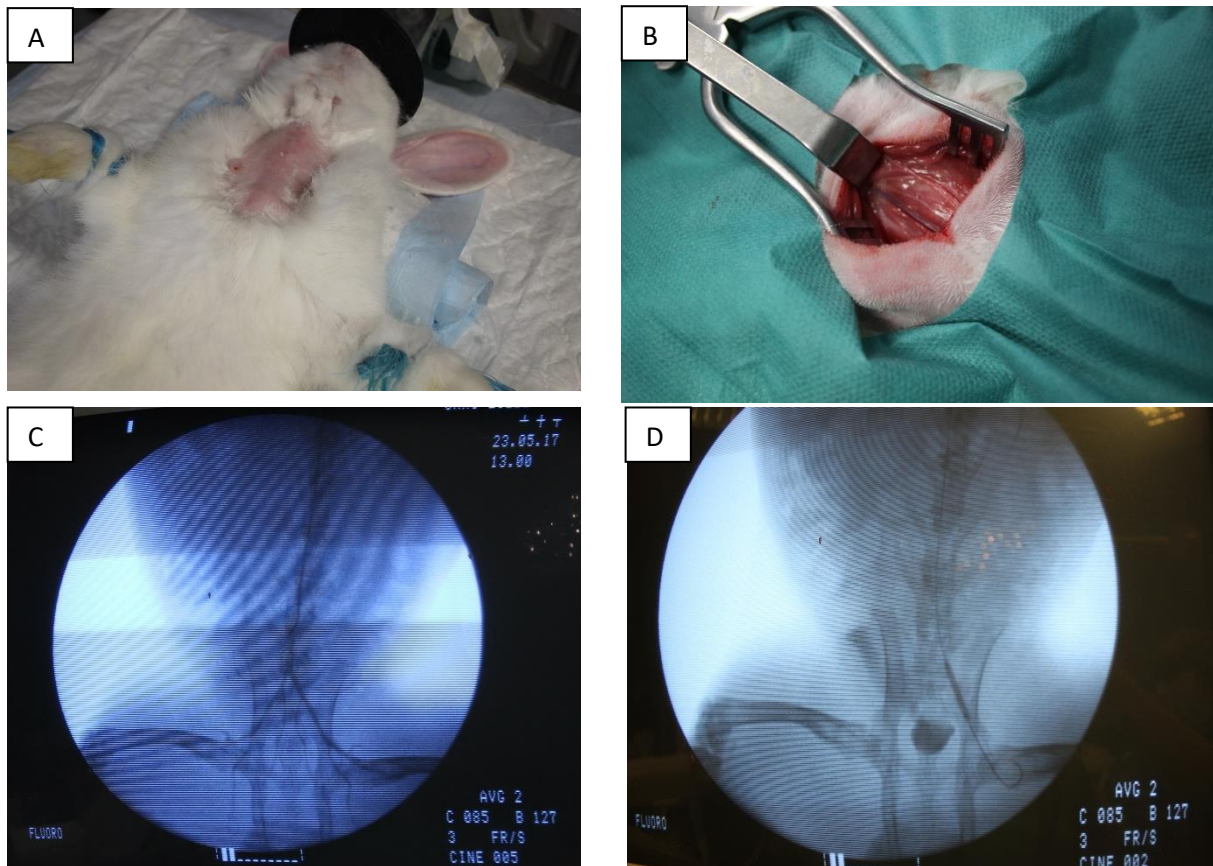


**Figure 4.3** : Schéma récapitulatif du déroulement des expérimentations chez le lapin hypercholestérolémique (d'après les travaux de J. Mougin) pour l'évaluation in-vivo des stents pro-cicatrisants. PO : per-os

Au terme de la première semaine de régime hypercholestérolémique, une lésion endothéliale était réalisée au ballon au niveau de chaque artère iliaque primitive. En pratique, chaque animal recevait 1 mL de Xylazine (20 mg) et de 1 mL de Kétamine (100mg) en IM, puis l'anesthésie générale était entretenue par de l'isoflurane 2,5% associé à de l'oxygène au masque pendant toute la durée du geste (1L/min).

Une incision longitudinale en regard de la trachée (Figure 4.4A) était pratiquée. Les tissus sous cutanés étaient sectionnés dans l'axe de l'incision cutanée, la veine jugulaire réclinée en dedans et la carotide gauche disséquée (Figure 4.4B). Un introducteur 4Fr (Radifocus TIF TIP®, TERUMO Tokyo, Japon) était mis en place, avant héparinisation par voie générale (héparine non fractionnée, 100 UI/kg). L'aorte thoracique était cathétérisée grâce à une sonde BERN 4Fr (TEMPO, Cordis, Milpitas, Californie, USA) et un guide souple TERUMO en J 0,035'' (Radifocus®, TERUMO, Tokyo, Japon). Une aortographie distale (DSA) par injection manuelle de 5mL de produit de contraste iodé (Xenetix 300, Guerbet, Villepinte, France) était réalisée (Figure 4.4C). Les artères iliaques étaient cathétérisées l'une après l'autre à l'aide d'un guide 0,018'' (V18, BostonScientific) et un ballon de 2,75 mm x 18 mm était gonflé à 9 atm puis retiré

gonflé jusqu'au niveau de la bifurcation aortique (266) dans chacune des 2 artères iliaques afin de créer une lésion intimale (Figure 4.4D). L'ensemble du matériel était ensuite retiré et l'artère carotide ponctionnée ligaturée. Les différents plans en avant de l'artère étaient refermés au vicryl 2/0 et fil à peau 3/0. Les animaux bénéficiaient d'une injection IM de 0,3mL Buprénorphine, répétée quotidiennement pendant 3 jours au décours de la procédure.

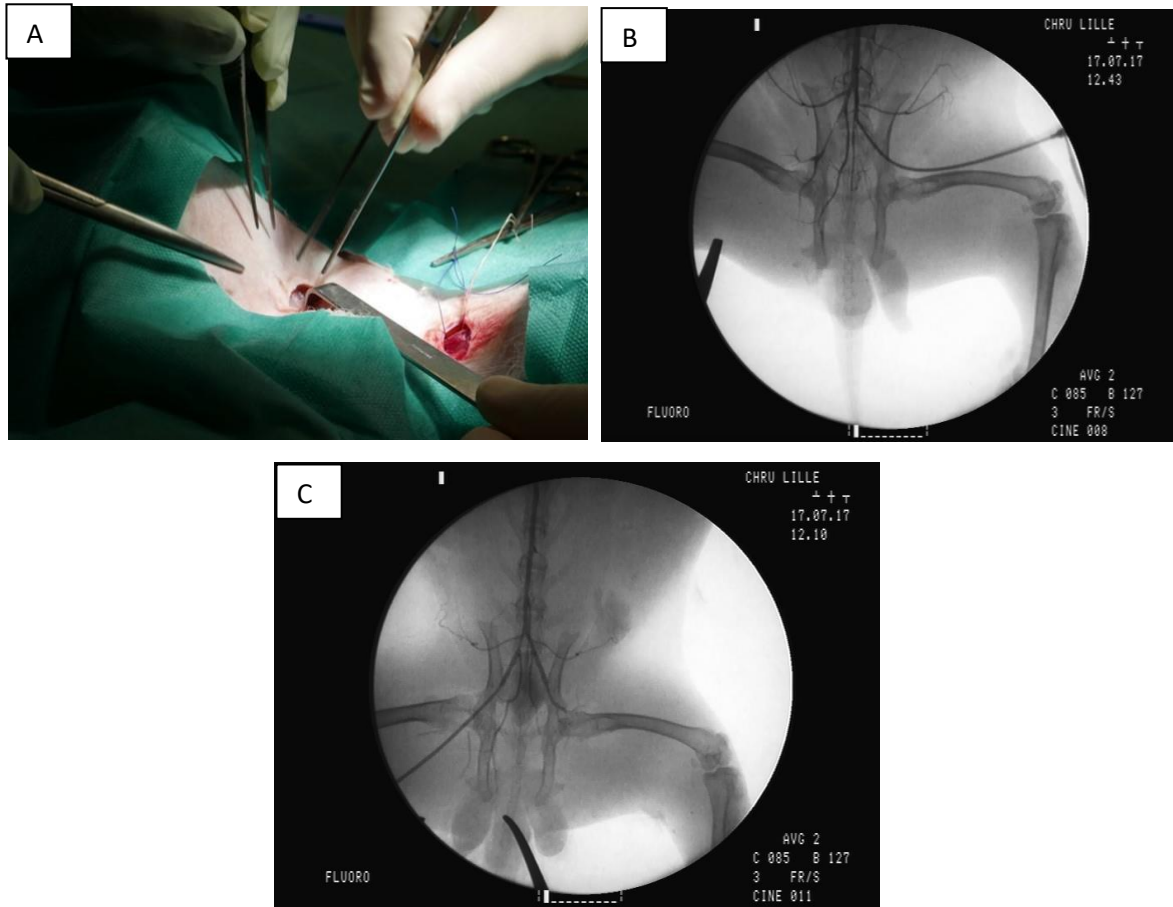


**Figure 4.4 :** Création de lésions intimales iliaques primitives au ballon. (A) Exposition de la zone pré-trachéale, (B) Dissection de la carotide gauche, (C) artériographie de l'aorte terminale et des axes iliaques primitives et (D) lésion artérielle au ballon des axes iliaques.

Huit semaines après la lésion intimale, les animaux bénéficiaient de l'implantation d'un stent (Figure 4.5) au niveau de chaque artère iliaque primitive (un stent fonctionnalisés CrCo-PDA-PEI-Hémimine, un stent témoin CrCo, longueurs et diamètre appariés, chaque animal agissant

comme son propre contrôle; Stents Multi-Link VISION<sup>®</sup>, Abbott Vascular, diamètres compris entre 2,5 et 2,75 mm et longueurs comprises entre 12 et 38 mm) par abord fémoral bilatéral.

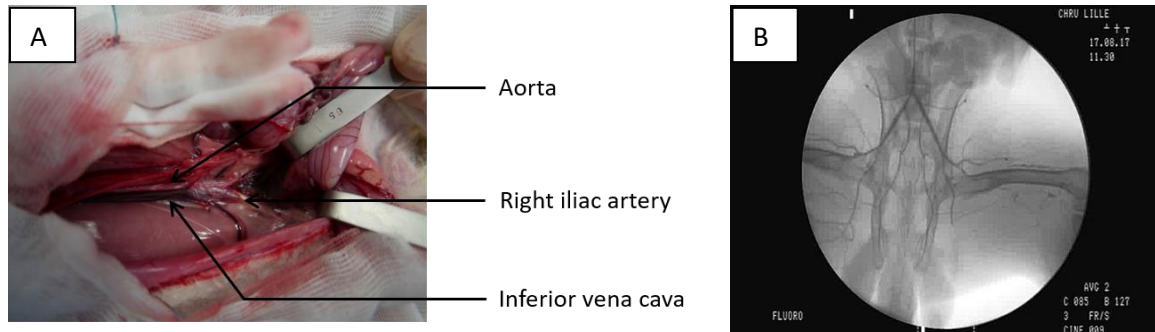
En pratique, l'anesthésie générale était conduite selon le protocole préalablement exposé, de même que l'analgésie postopératoire. Les artères fémorales étaient exposées par abord transversaux au niveau des plis inguinaux, avant la mise en place d'introducteurs 4Fr (Radifocus TIF TIP<sup>®</sup>, TERUMO Tokyo, Japon), puis héparinisation (100 UI/kg d'héparine non fractionnée en intra artériel). Une artériographie permettait de repérer l'artère iliaque primitive avant positionnement du stent. Chaque animal recevait 2 stents, un dans chaque artère iliaque primitive répartis de la façon suivante : un stent nu implanté à droite et un stent fonctionnalisé à gauche. Les stents étaient positionnés de manière protégée, c'est-à-dire que les lésions artérielles étaient préalablement franchies avec les introducteurs 4Fr afin de positionner les stents sans risque de dessertissage. Les stents étaient déployés sous contrôle scopique à 8 atmosphères (pression nominale). Un contrôle artériographie (injection manuelle de 5mL de Xenetix 300 via l'introducteur 4Fr) était réalisé après l'implantation de chaque stent. Les artères fémorales communes étaient ensuite liées, puis les abords refermés comme préalablement décrit au niveau cervical.



**Figure 4.4:** Illustration de la technique d'implantation des stents en position iliaque chez le lapin hypercholestérolémique. (A) Contrôle des artères fémorales communes, (B) artériographie avant stenting, (C) artériographie post stenting

Au terme de la 13<sup>ème</sup> semaine, les lapins étaient anesthésiés selon le protocole suivant. Sous anesthésie générale, une laparotomie médiane xypho-pubienne était réalisée et l'aorte sous rénale ainsi que les axes iliaques étaient exposés (Figure 4.5A). L'aorte sous rénale était ponctionnée à l'aide d'un cathlon 22G, une héparinisation par voie générale était réalisée, puis une artériographie (injection manuelle de 5mL de Xenetix 300) des axes iliaques permettait de vérifier la perméabilité des stents (Figure 4.5B). L'aorte sous rénale était ligaturée et l'ensemble de la bifurcation aorto-iliaque, incluant les segments stentés, était alors prélevée. Une dose létale de phénobarbital était injectée en intracardiaque. La zone

stentée était secondairement disséquée et recoupée environ 5mm au-dessus et en-dessous du stent, rincée au sérum physiologique et conservée dans du paraformaldéhyde à 4% (PAF).

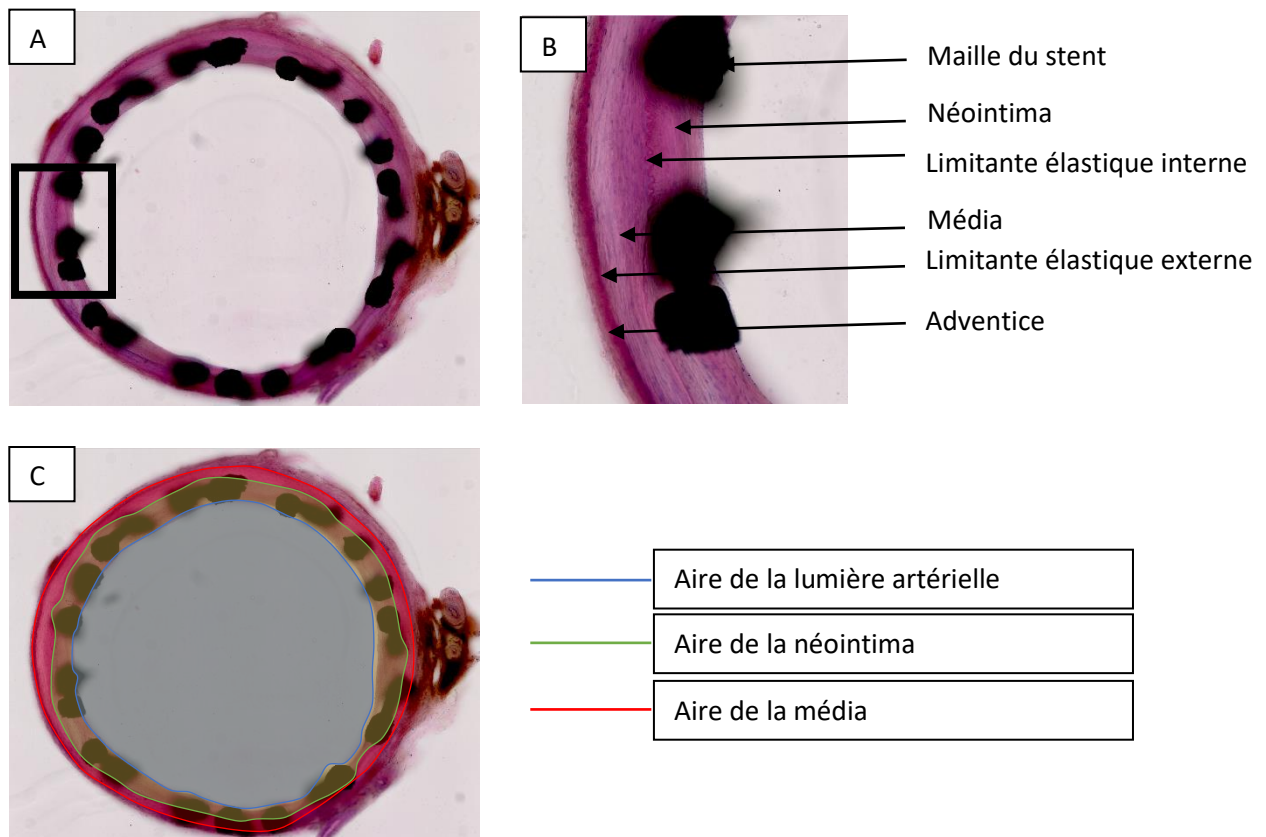


**Figure 4.5 :** Illustration du prélèvement des artères iliaques stentées lors du sacrifice des animaux au terme de la 13e semaine. (A) Dissection du carrefour aortique, (B) Artériographie avant explantation des artères stentées

Les prélèvements étaient ensuite déshydratés dans des bains successifs et de concentrations croissantes d'alcool puis mis en résine dans un polymère de méthylméthacrylate (Technovit®9100, Heraeus Kulzer, Allemagne - polymérisation à -20°C durant 5 jours, puis 4°C 8 jours). Les échantillons étaient ensuite coupés à différents niveaux du stent à l'aide d'un ultramicrotome (Micro-tronçonneuse (Strues Acutom 100) afin d'obtenir des coupes de 200µm. Les coupes étaient colorées à l'hématoxyline/éosine puis examinées au microscope optique (zoom x10) et enregistrées sous format numérique.

L'analyse histomorphologique était réalisée sur 5 coupes sélectionnées aléatoirement le long du stent à l'aide du logiciel ZEN (ZEN 2 version blue pour Windows) par estimation du rapport néointima/média (n/m) selon la méthode décrite Chapitre 2 et représentée Figure 4.6.





**Photo 4.6:** Analyse histomorphométrique des artères iliaques de lapin hypercholestérolémique stentées. (A) Coupe transversale caractéristique d'artère iliaque stentée de lapin numérisée (x10), (B) agrandissement de la zone encadrée. (C) Délimitation des principales aires d'intérêt (lumière artérielle, néointima et média) permettant de définir le rapport de surfaces de la néointima sur la média.

Cette expérimentation était réalisée sur 10 animaux.

#### *Analyses mécanistiques*

Les analyses mécanistiques étaient conduites par Western Blot sur le modèle de rat stenté en position aortique exposé au Chapitre 2, avec sacrifice et prélèvement au 7e jour après l'implantation. Quatre animaux étaient utilisés pour chaque groupe (CrCo, CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI-Hémimine).

Les anticorps primaires utilisés étaient : anti-Phospho-p38 et anti-p38, anti-Phospho-p44/42 (Erk1/2) et anti-p44/42, antiPhospho-Akt(Ser) et anti-Akt(Ser), achetés chez Cell Signaling Technology®.

De plus, l'expression des principales protéines impliquées dans la réponse inflammatoire était évaluée via un kit commercial (Kit Proteome Profiler, R&D Systems®, n=1, résultats moyennés sur deux tests, échantillons de broyats aortiques prélevés aléatoirement sur un rat de chaque groupe) selon les recommandations du fabricant.

#### 2.2.6. Analyses statistiques

Les variables quantitatives étaient exprimées en moyenne avec écart-type (ET) ou en médiane avec interquartile. Les variables qualitatives étaient présentées en pourcentage et en valeur absolue. En ce qui concerne les variables continues, la comparaison de deux échantillons indépendants a été effectuée avec un test t de Student si la normalité était vérifiée, sinon avec un test de Mann-Whitney. La comparaison de plus de deux échantillons était effectuée avec un test non paramétrique de Kolmogorov-Smirnov compte-tenu des effectifs. Une valeur de  $p < 0,05$  était considérée comme significative. Toutes les analyses statistiques étaient effectuées avec le logiciel SPSS (SPSS Statistics pour Windows, version 20.0., IBM Corp., Armonk, NY).

### 3. Résultats

#### 3.1. Analyse qualitative indirecte du greffage de l'hémine

Le test à l'acide orange II (Figure 4.7) était utilisé pour quantifier le nombre de fonctions amines exprimées en surface des différents revêtements. Trois groupes (n=3 par groupes) étaient constitués : CrCo-PDA, CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hémine.

On constatait que l'adjonction de la PEI permettait d'exprimer environ trois fois plus de fonctions amines en surface du revêtement, en comparaison au support CrCo-PDA, ce qui rejoint les résultats décrit Chapitre 3. Une fois l'hémine ajouté, il existait significativement moins de fonctions amines disponibles en surface, témoignant indirectement du greffage de l'hémine sur le support.

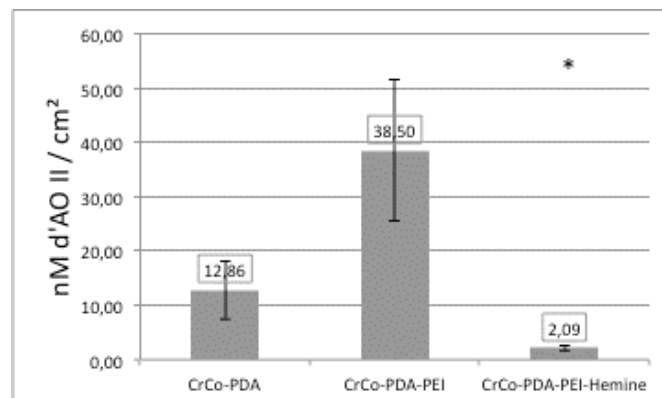


Figure 4.7: Dosage des fonctions amines en surface des différents supports par le test à l'acide orange II. (\* =  $p < 0,05$ ). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, AOII : Acide Orange II, nM : nanomoles.

#### 3.2. Analyse qualitative directe du greffage

Le test au luminol était négatif pour les échantillons CrCo, CrCo-PDA, CrCo-PDA-PEI et positif pour les échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine, confirmant la présence de fer en surface du revêtement CrCo-PDA-PEI-Hémine, témoin indirect de la présence d'hémine.

Les analyses en MEB-EDS sont présentées Figure 4.8. Le couplage EDS permettait de détecter un pic correspondant à la présence du fer en surface des échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine.

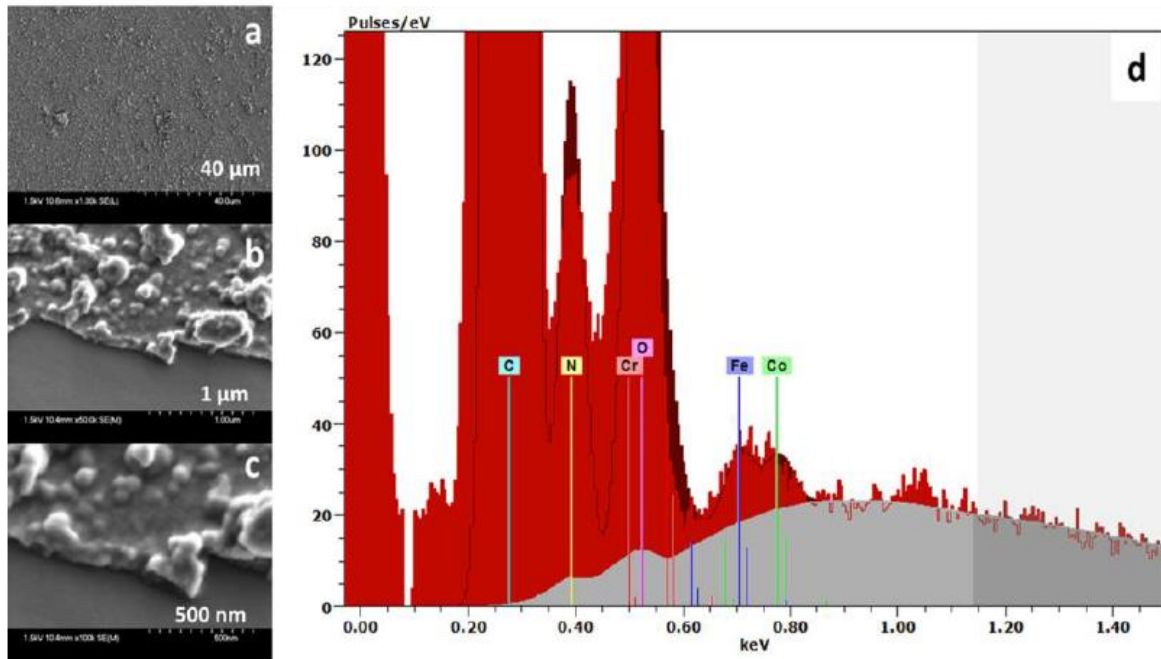


Figure 4.8: Aspect du revêtement CrCo-PDA-PEI-Hémine sous divers grossissements (a, b, c). Recherche en EDS de la présence de fer (pic violet Fe). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine. C : Carbone, N : Azote, Cr : Chrome, O : Oxygène, Fe : Fer, Co : Cobalt, EDS : Energy Dispersive X-ray Spectroscopy.

L'analyse en XPS des différents échantillons (Table 4.1) permettait de confirmer une augmentation de quantité d'azote et de carbone en surface entre les supports CrCo et CrCo-PDA (témoignant de la fonctionnalisation à la PDA) et entre les supports CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI (témoignant de l'enrichissement en amines par la PEI). Enfin, on voyait apparaître la présence de fer sur les échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine, ce qui confirme la présence d'hémine.

% en surface	C 1s	O 1s	Cr 2p	Co 2p	Mo 3d	Fe2p	N1s
<b>CrCo</b>	35.38	36.63	18.23	7.90	1.86	-	-
<b>CoCr-PDA</b>	74.23	18.41	-	-	-	-	7.36
<b>CoCr-PDA-PEI</b>	75.15	11.24	-	-	-	-	13.6
<b>CoCr-PDA-PEI-Hémine</b>	81.04	8.14	-	-	-	1.28	9.55

Table 4.1 : Analyses XPS des différents échantillons. Résultats exprimés en pourcentage de l'ensemble des atomes retrouvés en surface. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, C : carbone, O : Oxygène, Cr : Chrome, Co : Cobalt, Mo : Molybdène, Fe : Fer, N : Azote.

La cartographie TOF-SIMS des échantillons CrCo-PDA-PEI-Hémine (Figure 4.9) permettait de constater la présence d'atomes de fer en surface du revêtement, répartis de manière homogène. L'hémine étant la seule molécule contenant du fer sur l'ensemble du processus de fonctionnalisation, ceci permettait de confirmer un greffage homogène de l'hémine sur le revêtement.

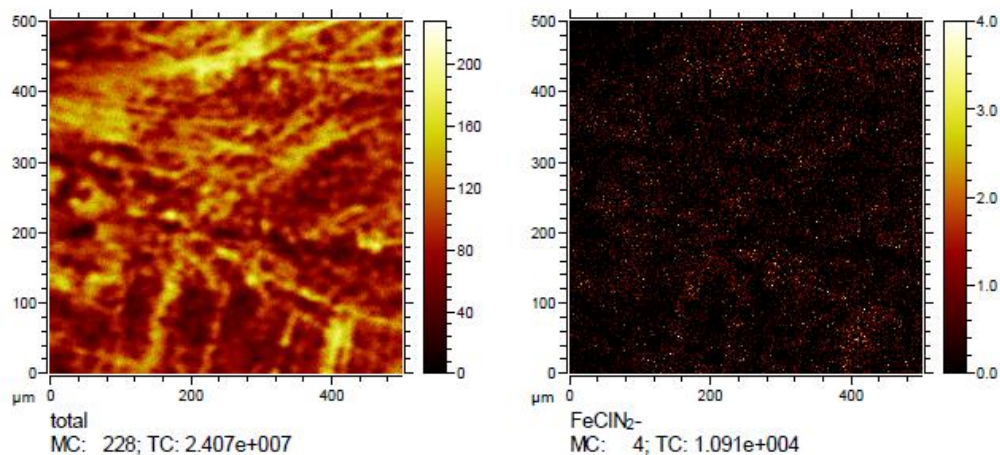


Figure 4.9 : A gauche, cartographie globale de l'échantillon CrCo-PDA-PEI-Hémine en TOF-SIMS. Recherche spécifique des atomes de fer en surface à droite (chaque atome de fer apparaît en rouge). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine.

### 3.3. Analyse quantitative du greffage de l'hémine

La quantification par ELISA (Figure 4.10, kit Abcam®, n=2/groupe, avec 3 mesures différentes (3 puits) par échantillons) permettait d'objectiver une quantité moyenne d'hémine greffée sur les supports CrCo-PDA-PEI-Hémine de  $10,8\text{ng/cm}^2$  ( $\pm 3,1\text{ng/cm}^2$ ).

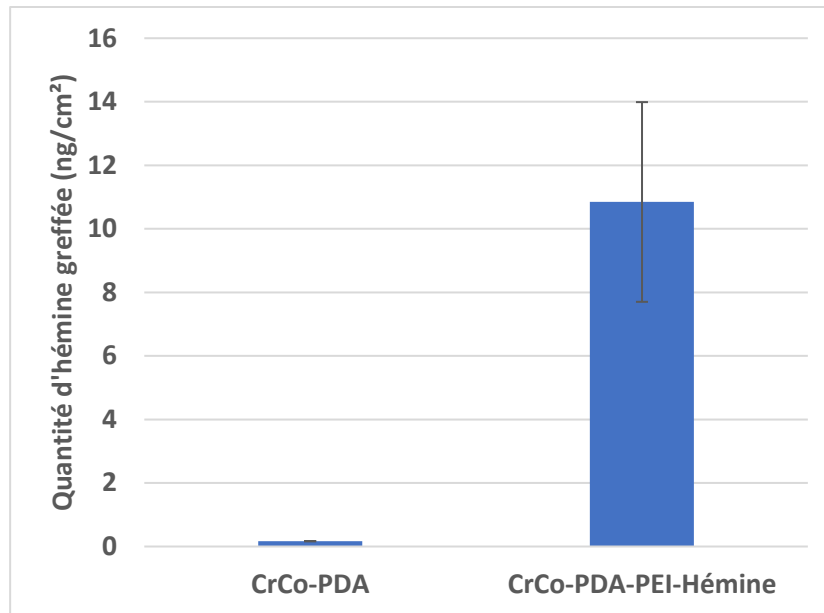


Figure 4.10 : Dosage de l'hémine par kit Abcam®. On ne retrouve pas d'hémine en surface des échantillons CrCo-PDA. La quantité greffée sur les supports CrCo-PDA-PEI-Hémine est de l'ordre de  $10\text{ng/cm}^2$ . CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine.

### 3.4. Expérimentations *in-vitro*

Les tests de vitalité et de prolifération conduits avec une lignée HPMEC ne mettaient pas en évidence de différence significative entre les différentes surfaces fonctionnalisées, à J3 comme à J6 (Figure 4.11). On remarquait cependant une diminution significative de la vitalité cellulaire entre CrCo et les autres groupes, à J3 et J6. Ces résultats avaient déjà été observés au Chapitre 3, et il n'y avait pas de différence entre les supports CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hémine.

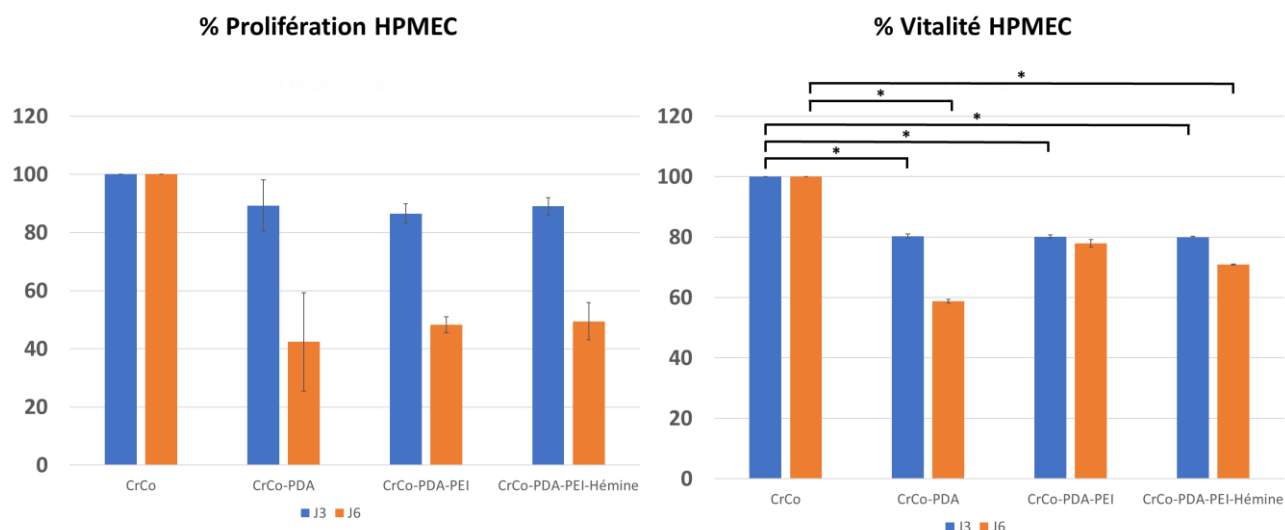


Figure 4.11 : Tests de prolifération et de vitalité cellulaire au bleu Alamar (lignée HPMEC) sur les différents échantillons à J3 (bleu) et à J6 (orange). Il n'existe pas de différence significative entre les différents échantillons à J3 ( $p=0,058$ ) et à J6 ( $p=0,093$ ) sur la prolifération, mais celle-ci semble diminuer sur les échantillons fonctionnalisés par rapport au CrCo. La vitalité est similaire à J3 et J6 sur les échantillons fonctionnalisés, mais elle est significativement diminuée par rapport au support nu (J3, CrCo vs CrCo-PDA,  $p=0,015$ , CrCo vs CrCo-PDA-PEI,  $p=0,037$ , CrCo vs CrCo-PDA-PEI-Hémine,  $p=0,01$  ; J6, CrCo vs CrCo-PDA,  $p=0,001$ , CrCo vs CrCo-PDA-PEI-Hémine,  $p=0,006$ ). CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, HPMEC : Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells.

Concernant les échantillons CrCo et CrCo-PDA, on constatait que les résultats obtenus par les tests de cytocompatibilité avec la lignée cellulaire HPMEC étaient différents de ceux retrouvés avec la culture primaire HUVEC (pas d'amélioration de la prolifération des EC) au Chapitre 2. Ces différences s'expliquent probablement en partie par une perte du phénotype endothélial dans la lignée HPMEC, avec perte des capacités de synthèse du monoxyde d'azote et de prostaglandine I<sub>2</sub>. Ces caractéristiques sont conservées dans la culture primaire de cellules HUVEC, et seraient impliquées dans l'effet pro-cicatrisant de la PDA (193). L'ajout de PEI ou d'hémine ne semblait pas diminuer la cytocompatibilité des revêtements.

### 3.5. Expérimentations animales

#### *Analyses histomorphologiques*

Quatre lapins décédaient lors de l'expérimentation, dont deux de cause infectieuse avant l'implantation des stents (une péritonite et une otite). Pour un autre lapin, les stents utilisés étaient trop longs (34 mm) par rapport aux iliaques primitives, entraînant la nécessité de les déployer en kissing dans l'aorte terminale. Cette manœuvre s'est compliquée d'une rupture aortique entraînant le décès de l'animal. Enfin, le quatrième lapin présentait des plaies au niveau des pattes arrières avec des signes de souffrance. Une euthanasie a donc été décidée. L'autopsie n'a pas retrouvé d'argument pour une origine vasculaire, et en particulier pas de thrombose des stents mis en place.

Au terme de l'expérimentation, les six lapins restants étaient sacrifiés conformément au protocole. L'analyse histomorphologique (Figure 4.12) retrouvait des résultats discordants en fonction des animaux, avec toutefois une tendance à l'augmentation du rapport n/m en présence d'hémine, comparativement aux stents nus.



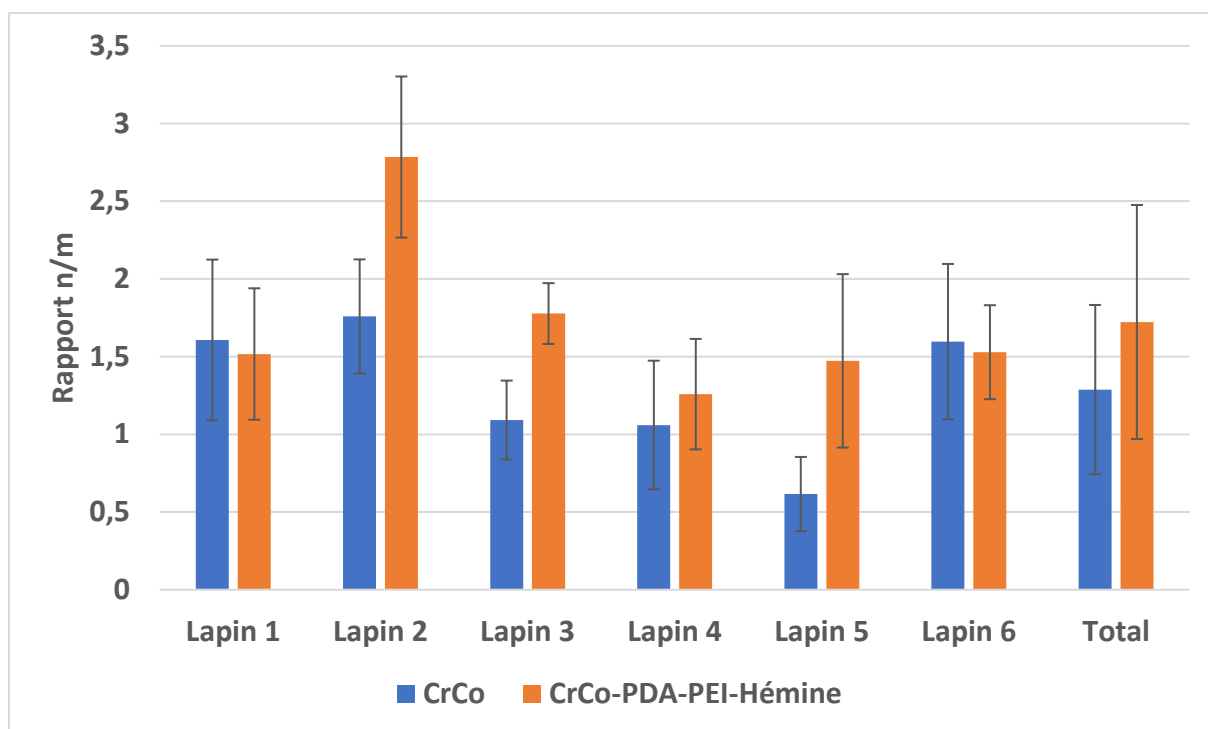


Figure 4.12 : Analyses histomorphométriques après implantation de stents nus en chrome-cobalt (CrCo) et fonctionnalisés à l'hémine (CrCo-PDA-PEI-Hémine) en position iliaque primitive chez des lapins hypercholestérolémiques. Résultats exprimés en rapport des surfaces de la néointima (n) sur la média (m) sur cinq coupes choisies aléatoirement le long de chaque stent. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine.

#### *Analyses mécanistiques*

Un rat décédait précocement de complications chirurgicales dans le groupe hémine. En Western Blot, l'analyse de l'activation de la Kinase p38 (impliquée dans la régulation de la prolifération des SMC) dans le tissu aortique 7 jours après l'implantation des stents, révélait une augmentation de la forme active de cette protéine (non significative) dans les groupes CrCo-PDA et CrCo-PDA-PEI-Hémine en comparaison au groupe témoin. Il n'existait cependant pas de différence significative de l'activation de p38 après adjonction de l'hémine (Figure 4.13), ce qui signifierait que l'effet observé soit principalement lié à la PDA.

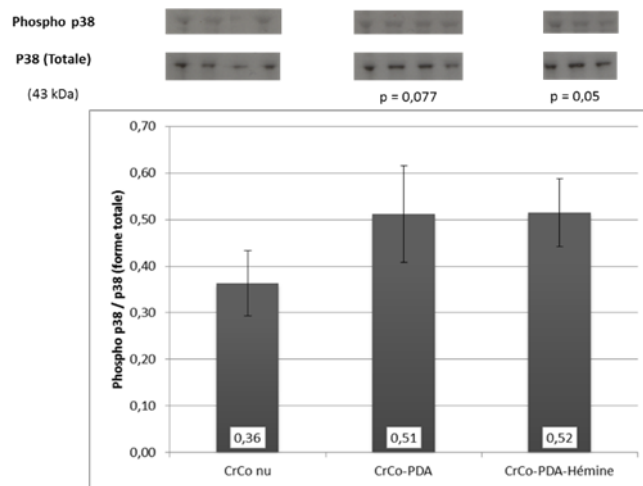


Figure 4.13 : Analyse par Western Blot de l'activation de p38 dans le tissu aortique stenté. Chaque puits représente un rat. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, SMC : smooth muscular cells.

L'analyse des voies cellulaires impliquées dans la prolifération des SMC (P42/44 et Akt(Ser)) montrait une tendance à une activation moins prononcée en présence d'hémine, par rapport aux groupes CrCo et CrCo-PDA-PEI-Hémine (Figure 4.14), ce qui pourrait témoigner d'une conservation de l'effet inhibiteur de l'hémine sur la prolifération des SMC identifié lors de son administration systémique(210), même si ce phénomène apparaît moins marqué avec l'administration locale.

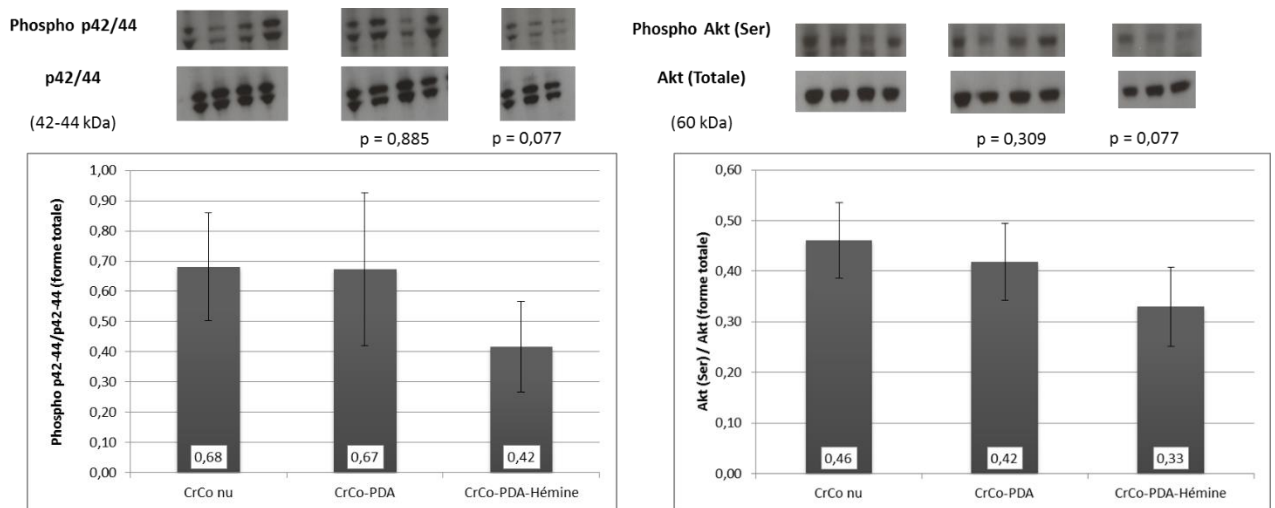


Figure 4.14: Analyse par Western Blot des voies de prolifération des SMC. L'activation des voies de prolifération médiées par p42/44 et de Akt(Ser) semblait diminuer en présence d'hémine. Chaque puits représente un rat. CrCo : Cobalt-Chrome, PDA : Polydopamine, PEI : Polyéthylèneimine, SMC : Smooth Muscular Cell.

Par ailleurs, l'étude des différentes cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire identifiait une surexpression de la plupart des cytokines entre le stent CrCo nu et le stent fonctionnalisé à la PDA (Figure 4.15). L'expression de ces cytokines pro-inflammatoires semblaient à l'inverse globalement diminuer entre le stent CrCo-PDA et le stent CrCo-PDA-PEI-Hémine, sans toutefois retrouver les niveaux obtenus avec le stent nu. Ce résultat suggère que l'hémine pourrait entraîner une réduction des phénomènes inflammatoires locaux après implantation d'un stent, tout comme après administration systémique. On constatait également que l'expression de VEGF (facteur de croissance endothélial) était plus importante chez les rats CrCo-PDA et CrCo-PDA-Hémine. L'interprétation de ces résultats doit bien entendu être réalisée avec précaution puisqu'un seul animal était représenté par groupe.

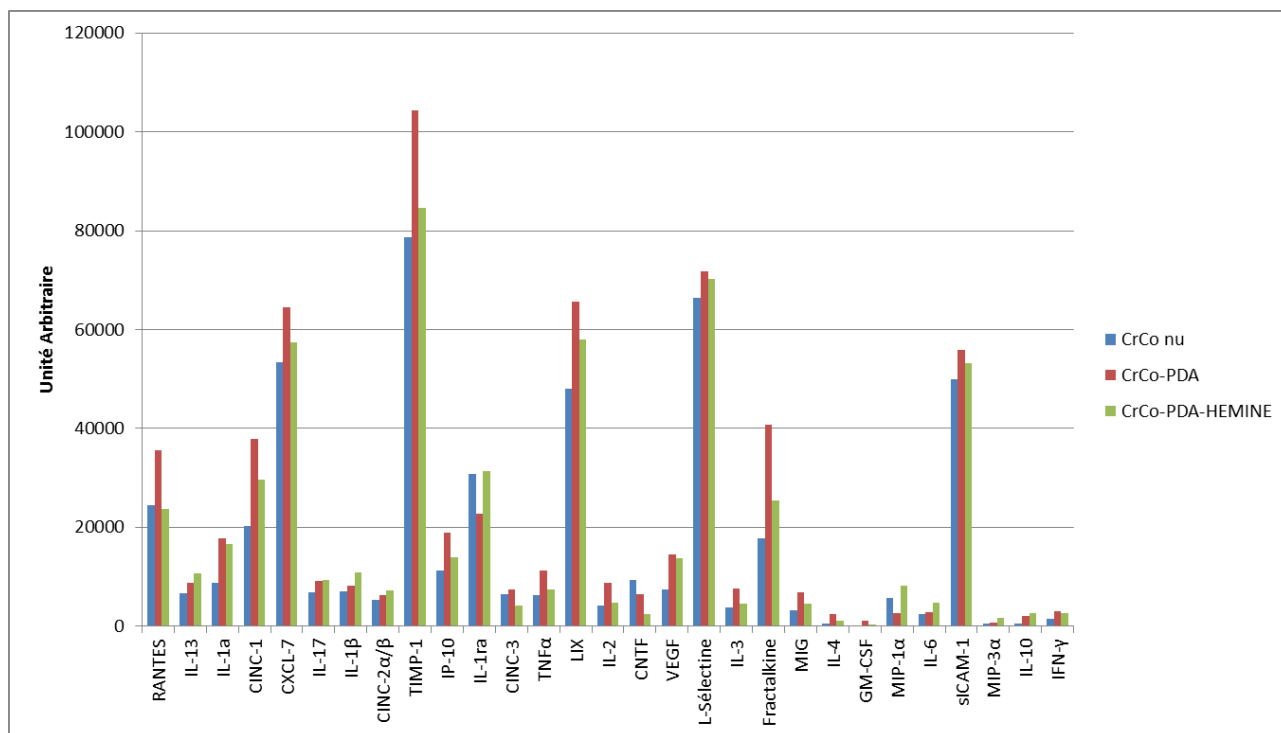


Figure 4.15 : Analyse par Western Blot (Kit Proteome Profiler, R&D Systems®) des mécanismes inflammatoires après l'implantation des différents stents (n=1, lecture moyennée sur deux tests).

## 4. Discussion

L'une des principales problématiques liées à l'utilisation de l'hémine est la difficulté à déterminer une méthode efficace d'évaluation des quantités ou concentrations, en solution ou en surface. Notre première approche a consisté en une tentative de dosage direct de l'hémine libérée dans les milieux d'extraction en spectrométrie UV/Vis. En effet, les molécules de la famille des porphyrines, dont fait partie l'hémine, possèdent la propriété d'avoir une zone d'absorption intense dans la partie bleu-violette du spectre visible, appelée Bande de Soret. La bande de Soret vient d'un mouvement de dipôle électronique qui permet une transition  $\pi\text{-}\pi^*$ , commune chez les porphyrines. Usuellement situé aux alentours de 400 nm, le maximum d'absorption du pic de Soret dépend du solvant utilisé (et notamment de sa polarité). Cette technique s'est malheureusement révélée non réalisable du fait d'une interférence importante avec le spectre de la PDA.

Dans les milieux physiologiques, susceptibles de contenir de nombreuses interférences UV dans la bande de Soret du fait du contenu protéique (267), il a été proposé de complexer l'hémine avec la pyridine au niveau des deux sites de liaisons disponibles sur le fer. Le complexe créé est dit hémochromogène, c'est-à-dire qu'il associe une molécule d'hème avec une base azotée ou avec une protéine autre que la globine et possède la particularité de rehausser l'absorption du complexe. Du fait de l'interférence avec la dopamine, nous avons tenté d'introduire de la pyridine dans nos échantillons afin rehausser le seuil de détection de l'hémine (résultats non présentés). Cependant, cette méthode a été abandonnée du fait de sa complexité, de son manque de reproductibilité et de la toxicité importante de la pyridine.

Nous avons également tenté de mettre au point une méthode de dosage par Chromatographie Haute Performance en Phase Liquide (HPLC) d'après les travaux rapportés

par Bauer et Fornnarino (265). Plusieurs phases mobiles associant différentes concentrations méthanol:acétonitrile:DMSO ont été testées (HPLC LC-2010AHT (Schimadzu), colonne microporeuse Chromolith® Performance, pré-colonne Chromolith®, débit 0.5 à 3mL/min, couplage spectromètre UV/Vis, (Lambda 25, Perkin), lecture à 385 nm). La détection d'hémine était possible pour des quantités faibles de l'ordre de quelques nM lorsqu'elle était seule en solution. Cependant, aucune des méthodes ou phases mobiles testées n'a permis de séparer correctement les pics de l'hémine et de la dopamine, et donc de réaliser une analyse quantitative.

Afin de confirmer la présence d'hémine sur les supports CoCr, nous avons donc décidé dans un premier temps de vérifier indirectement que les fonctions amines disponibles en surface des supports CrCo-PDA-PEI étaient occupées après l'ajout d'hémine, grâce à un dosage colorimétrique à l'AOII. Ce test étant concluant, nous avons utilisé diverses méthodes visant à déterminer la présence de fer en surface de nos échantillons (test au luminol, XPS et TOF-SIMS), l'hémine étant le seul donneur de fer au travers des différentes étapes de fonctionnalisation. Ceci nous a permis de prouver la présence de fer sur nos échantillons, et donc à priori d'hémine. La seule méthode de quantification de l'hémine que nous avons pu identifier est le dosage par ELISA. Elle possède un excellent seuil de détection, et offre la possibilité de fournir une information qualitative supplémentaire (la réaction imposant que l'hémine puisse être reconnue par son enzyme de dégradation). Cependant, le recours à cette technique est limité par son coût et par sa difficulté de réalisation. Toutefois, elle nous a permis d'évaluer la quantité d'hémine greffée sur les supports à environ 10 ng/cm<sup>2</sup>.

Les analyses histomorphométriques n'ont pas permis de mettre en évidence une limitation de la RIS avec les stents fonctionnalisés à l'hémine. Malgré les résultats démontrant l'effet

bénéfique de l'administration systémique d'hémine sur la resténose(210), la concentration minimale pour obtenir un effet similaire par application locale reste indéterminée. Il est possible que les quantités d'hémine greffées avec notre protocole soient insuffisantes pour limiter la RIS. De même, la cinétique de libération de l'hémine (par dégradation du revêtement) n'a pas pu être étudiée compte-tenu des difficultés de dosage, et il est possible que l'hémine immobilisée ne soit pas disponible pour interagir avec l'HO-1 et entraîner une réponse au niveau cellulaire. Des premiers éléments de réponse pourraient être obtenus en étudiant l'impact de surfaces CrCo-PDA-PEI-Hémine *in-vitro* sur des cultures primaires d'HUVEC et d'HUASMC, ce qui n'a pas été réalisé dans ce travail.

Dans les travaux de Thèse de B. Maurel, l'étude des mécanismes protéiques mis en jeu après administration intra-péritonéale (IP) d'hémine toutes les 48 heures a révélé une diminution de l'expression de Ki-67 et des protéines impliquées dans la prolifération des cellules musculaires lisses (p42/44, Akt,...). Dans ce travail, nous avons retrouvé une tendance comparable, mais moins marquée et non significative, par administration locale d'hémine via un stent. En effet, nous avons constaté une diminution des formes phosphorylées (activées) de p44 MAPK/p42 MAPK (ERK1/2), connues pour former un complexe avec les facteurs de transcription Elk-1 et Sap-1, qui se lie au promoteur de gènes tel que c-fos, pour entraîner la prolifération, le changement de phénotype et la migration des SMC. Nous avons également identifié une diminution de l'expression de la forme active de Akt, Akt(Ser), qui se lie au récepteur cible de la rapamycine (mTOR) pour déclencher la prolifération cellulaire. Ces deux voies sont connues pour être les principales responsables de la prolifération et de la différenciation des SMC. De plus, il semble exister une activation de la voie associée à la MAPKinase-p38, dont la forme phosphorylée a été identifiée comme régulant de la prolifération des SMC (268). Nous avons tenté d'analyser par western-blot l'activation de HO-

1 dans les broyats aortiques après implantation de stents fonctionnalisés, mais la sensibilité de notre technique était insuffisante pour observer une différence entre nos échantillons (sous le seuil de détection, résultats non présentés). La détection d'hémine dans le tissu aortique par d'autres méthodes s'avère complexe, compte-tenu des similitudes entre cette molécule et l'hème, présente en concentrations importantes.

Par ailleurs, toujours dans les travaux de B. Maurel, l'administration IP d'hémine chez le rat stenté en position aortique avait conduit à une diminution de l'expression des principales protéines impliquées dans la réponse inflammatoire (figure 4.16) dans le broyat aortique. Dans notre travail, ces protéines sont surexprimées après l'implantation d'un stent CrCo-PDA, et même si une diminution de leur expression était constatée dans le groupe CrCo-PDA-PEI-Hémine, les valeurs observées restaient toujours supérieures au groupe stent nu.

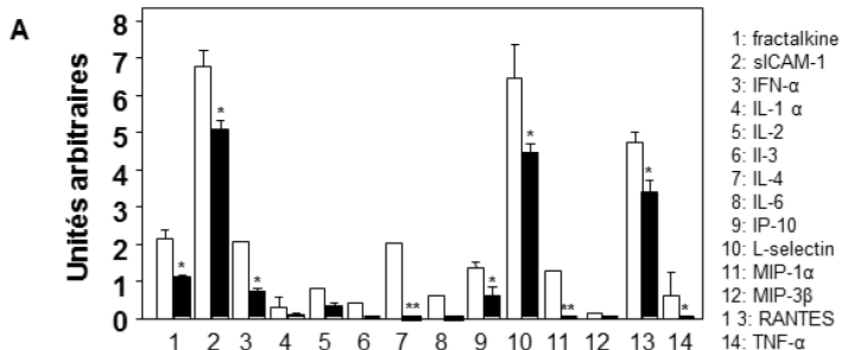


Figure 4.16 : Expression des cytokines inflammatoires chez le rat stenté en position aortique à 7 jours avec administration intra-péritonéale quotidienne d'hémine (barres noires) ou de placebo (barres blanches). Issu des travaux de thèse de B. Maurel.

On peut donc supposer qu'une quantité de 10ng/cm<sup>2</sup> d'hémine immobilisée sur un stent n'est pas suffisante pour obtenir une réponse similaire à celle obtenue par l'administration en plus grande quantité d'hémine par voie systémique sur les voies d'inhibition de la prolifération des SMC et la réponse inflammatoire.



L'effet pro-cicatrisant identifié chez le rat avec les stents CrCo-PDA au Chapitre 2 n'est plus retrouvé chez le lapin hypercholestérolémiques avec les stents CrCo-PDA-PEI-Hémine, ce qui laisse supposer que l'adjonction d'hémine (ou de PEI) pourrait inhiber l'effet pro-cicatrisant des surfaces de PDA. Cette hypothèse devra être explorée, notamment en étudiant l'impact des supports CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hémine comparativement à CrCo-PDA chez le rat stenté en position aortique.

## 5. Conclusion intermédiaire

Il est possible de greffer l'hémine de manière covalente sur une surface fonctionnalisée par polydopamine, en utilisant une polyéthylèneimine comme intermédiaire. L'immobilisation d'hémine a pu être confirmée sur les surfaces CrCo-PDA-PEI-Hémine, avec une quantité évaluée à 10ng/cm<sup>2</sup>. La cytocompatibilité des échantillons CrCo-PDA-PEI et CrCo-PDA-PEI-Hémine ne semble pas différer de celle des échantillons CrCo-PDA de manière significative. Les stents enduits à l'hémine semblent entraîner *in-vivo* une inhibition des voies de prolifération des cellules musculaires lisses, et l'effet inducteur de la polydopamine sur l'activation de la voie inhibitrice de la prolifération de cette même population cellulaire semble maintenu. Les stents CrCo-PDA-PEI-Hémine n'ont malheureusement pas montré d'efficacité sur la resténose dans le modèle de lapin hypercholestérolémique. Plusieurs éléments suggèrent que ceci pourrait être lié à une quantité trop faible de principe actif greffé ou libéré. Par ailleurs, l'effet pro-cicatrisant retrouvait *in-vivo* précédemment avec la polydopamine seule n'était plus constaté après ajout de polyéthylèneimine et d'hémine. Cette stratégie d'immobilisation de l'hémine via un polymère de polydopamine ne semble donc pas efficace en termes de prévention de la resténose.

## DICUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES DE RECHERCHE

Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé que l'effet pro-cicatrisant de la polydopamine observé *in-vitro* était retrouvé *in-vivo* dans un modèle de rat. Ces résultats sont encourageants, mais plusieurs éléments restent à éclaircir. En effet, les mécanismes sous-jacents à cet effet pro-cicatrisant restent à déterminer. En western-blot, nous avons pu observer une tendance à l'inhibition des voies de prolifération des cellules musculaires lisses (voies médiées par la MAP-Kinase p42/44 et la Phospho-Kinase Akt). Nous n'avons toutefois pas réussi à identifier de mécanismes favorisant la prolifération des cellules endothéliales. Plusieurs publications d'une même équipe(194,225,239) suggèrent que ce mécanisme serait médié par une augmentation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO) endogène et de prostaglandine I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) en présence de PDA. Nous avons conduit plusieurs tests *in-vitro* sur cultures d'HUVEC sur supports CrCo ou CrCo-PDA (dosage du NO au réactif de Griess, dosage de la PGI<sub>2</sub> en ELISA compétitive (kit commercial)) pour confirmer cette hypothèse, mais sans succès. Une alternative pourrait être d'analyser directement l'activation de l'enzyme eNOS (Nitric Oxyde Synthase) par immunomarquage des HUVECs sur CrCo et CrCo-PDA *in vitro*, ou par western-blot *in-vivo*.

Le modèle animal de resténose chez le rat est facilement disponible et permet l'analyse des mécanismes moléculaires impliqués dans les réponses observées en Western Blot. Il présente cependant certaines limites. Les animaux utilisés sont jeunes et sains, et le rat est connu pour développer peu d'athérome. De plus, pour des raisons anatomiques, l'implantation des stents ne peut être réalisée qu'en position aortique. Cependant, les caractéristiques de la paroi vasculaire varient entre l'aorte, qui a une composante majoritairement élastique, et les artères coronaires ou périphériques, qui ont une composante musculaire prédominante.

L'analyse histomorphométrique semble plus pertinente dans le modèle d'artère iliaque pathologique de lapin hypercholestérolémique, mais ce modèle est fragile et soumis à une variabilité importante (environ 20% des lapins sont non-répondeurs au régime et ne développent pas d'athérome). Ce modèle animal fait actuellement l'objet d'optimisation dans le cadre des travaux de thèse de J. Mougin.

Le stent CrCo-PDA pourrait ensuite être comparé au gold-standard actuel, c'est-à-dire une plateforme en CrCo libérant de l'évérolimus (Xience®, Abbott Vascular) afin de déterminer si son potentiel est au moins équivalent à ce dernier.

L'ajout de PEI selon notre protocole semble annuler l'effet pro-prolifératif des surfaces enduites de PDA sur les cultures primaires d'HUVEC. Il est nécessaire d'évaluer si l'inhibition de la prolifération des SMC est maintenue avec les surfaces CrCo-PDA-PEI pour comprendre si un effet pro-cicatrisant peut toujours être attendu après cette étape. Ceci devra être réalisé en étudiant 1) le comportement d'une culture primaire d'HUASMC sur des supports CrCo-PDA-PEI comparativement aux surfaces CrCo-PDA et 2) l'activation de la voie cellulaire inhibitrice médiée par la MAP-Kinase p38 après implantation de stents CrCo-PDA-PEI *in-vivo*.

Les paramètres de greffage de la PEI n'ont pas été optimisés dans ce travail. Le protocole utilisé est basé sur l'hypothèse d'une saturation des surfaces de PDA en recourant à une solution très concentrée de PEI (50g/L, pression de concentration). L'impact de différentes concentrations de PEI sur la conservation ou non du potentiel pro-cicatrisant apporté par la PDA pourrait être évalué *in-vitro*. Il sera également nécessaire de confirmer l'absence de potentiel pro-thrombogène de ce revêtement, et d'étudier l'agrégation plaquettaire (dosage du LDH et évaluation qualitative en MEB du morphotype de plaquettes immobilisées).

La quantité d'hémine immobilisée ne semble pas permettre localement de diminuer la RIS. Deux hypothèses peuvent être soutenues pour expliquer ce résultat. D'une part, la quantité d'hémine greffée pourrait être trop faible pour entraîner une réponse quantifiable et visualisable, d'autre part l'hémine immobilisée pourrait ne pas être disponible pour interagir avec l'HO-1.

Le premier écueil pour étayer ces hypothèses est lié aux difficultés rencontrées à déterminer une méthode fiable, reproductible et peu coûteuse de quantification de l'hémine. Cette problématique limite les possibilités d'optimisation de la plateforme, puisque les quantités immobilisées et les cinétiques de libérations statiques ou dynamiques ne peuvent être évaluées. Une méthode indirecte, basée sur la technique ELISA et visant à quantifier l'activité de l'HO-1 pourrait être utilisée mais serait particulièrement onéreuse. Le dosage du fer par spectrométrie d'absorption atomique(269) pourrait permettre d'évaluer la quantité d'hémine libérée. Cependant, cette méthode est destructive et il serait nécessaire dans un premier temps de vérifier que son seuil de sensibilité est suffisant pour détecter des quantités de fer de l'ordre du ng.

Une stratégie basée sur l'élaboration d'un complexe PEI/Hémine(245), ou de micro-capsules de PEI contenant de l'hémine, qui seraient directement adsorbés sur des surfaces de PDA pourrait être élaborée afin de mieux maîtriser la quantité d'hémine greffée et sa biodisponibilité. Une étape de validation *in-vitro* comprenant des cultures primaires HUVEC et HUASMC sur les supports obtenus et une évaluation de l'hémocompatibilité, avec notamment un test d'agrégation plaquettaire (Dosage du LDH et analyse qualitative en MEB) serait nécessaire avant de proposer une nouvelle expérimentation sur un modèle animal.

La réponse des revêtements aux différents procédés de stérilisation n'a pas été explorée. La stérilisation par oxyde d'éthylène semble être la méthode utilisée par la plupart des industriels, et devra donc être testée en première intention. Son impact sur la cytocompatibilité et la tenue du revêtement devra être étudiée.

Des travaux conduits *in-vitro* au sein de notre laboratoire ont démontré que le revêtement de PDA présentait une résistance satisfaisante aux contraintes mécaniques et notamment à la déformation (expansion des stents via un ballonnet). Ces tests devront être répétés pour chaque étape de la fonctionnalisation. De même, différents tests de résistance mécanique des stents après fonctionnalisation pourront également être conduits afin de s'assurer que les propriétés mécaniques restent similaires aux stents non fonctionnalisés.

## CONCLUSION GENERALE

Dans la première partie de ce travail, nous avons démontré que la polydopamine, polymère bioinspiré et biocompatible, permettait de limiter les phénomènes de resténoses après implantation d'un stent en position aortique chez le rat. Ces résultats sont liés à un effet pro-cicatrisant, par inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses (confirmée *in-vitro* et *in-vivo*) et augmentation de la prolifération des cellules endothéliales (confirmée *in-vitro*). Ces résultats doivent encore être confirmés dans un second modèle animal, idéalement pathologique (lapin hypercholestérolémique). De plus, le revêtement de polydopamine offre la possibilité d'immobiliser d'autres molécules à effet thérapeutique pertinent sur sa surface afin d'obtenir un effet synergique potentiel.

Les surfaces de polydopamine obtenues ne présentaient pas suffisamment de fonctions amines disponibles pour immobiliser notre principe actif, l'hémine. Dans la seconde partie de ce travail, nous avons donc développé une stratégie d'enrichissement de la polydopamine en fonctions amines par l'ajout de polyéthylèneimine. Cette étape de fonctionnalisation ne semble pas diminuer la cytocompatibilité du revêtement, mais l'effet pro-cicatrisant observé avec la polydopamine seule pourrait ne pas être maintenu.

Les surfaces modifiées permettaient de greffer avec succès environ 10ng/cm<sup>2</sup> d'hémine. Les stents obtenus semblaient cependant moins performants que les stents nus en termes de prévention de la resténose intra-stent dans un modèle d'artère iliaque pathologique de lapin hypercholestérolémique. Ce résultat pourrait s'expliquer par une quantité trop faible de principe actif immobilisé, ou par des difficultés de biodisponibilité, car l'inhibition des voies de prolifération des cellules musculaires lisses médiées par les MAP-Kinase p42/44 et PhosphoK Akt(Ser) et la diminution de l'expression des principales cytokines inflammatoires retrouvées

après injection intra-péritonéale de grandes quantités d'hémine chez le rat n'étaient pas retrouvées après libération *in-situ* via le stent développé dans ce travail.



## REFERENCES

1. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull WJ, Rosenfeld ME, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994 May;89(5):2462–78.
2. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull WJ, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995 Sep 1;92(5):1355–74.
3. AbuRahma AF, Hayes JD, Flaherty SK, Peery W. Primary iliac stenting versus transluminal angioplasty with selective stenting. *J Vasc Surg*. 2007 Nov;46(5):965–70.
4. Fischman DL, Leon MB, Baim DS, Schatz RA, Savage MP, Penn I, et al. A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1994 Aug 25;331(8):496–501.
5. Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O’Shaughnessy C, et al. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003 Oct 2;349(14):1315–23.
6. Lejay A, Georg Y, Bajcz C, Thaveau F, Geny B, Kretz J-G, et al. Endovascular treatment of infrapopliteal arteries in patients with critical limb ischemia. *Acta Chir Belg*. 2009 Dec;109(6):684–93.
7. Bennett MR, O’Sullivan M. Mechanisms of angioplasty and stent restenosis: implications for design of rational therapy. *Pharmacol Ther*. 2001 Aug;91(2):149–66.
8. Muto A, Fitzgerald TN, Pimiento JM, Maloney SP, Teso D, Paszkowiak JJ, et al. Smooth muscle cell signal transduction: implications of vascular biology for vascular surgeons. *J Vasc Surg*. 2007 Jun;45 Suppl A:A15-24.
9. Roos TU, Heiss EH, Schwaiberger AV, Schachner D, Sroka IM, Oberan T, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 $\alpha$ , and heme oxygenase-1. *J Nat Prod*. 2011 Mar 25;74(3):352–6.
10. Zuckerbraun BS, Shapiro RA, Billiar TR, Tzeng E. RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*. 2003 Aug 19;108(7):876–81.
11. Besson A, Gurian-West M, Schmidt A, Hall A, Roberts JM. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. *Genes Dev*. 2004 Apr 15;18(8):862–76.
12. Suzuki T, Kopia G, Hayashi S, Bailey LR, Llanos G, Wilensky R, et al. Stent-based delivery of sirolimus reduces neointimal formation in a porcine coronary model. *Circulation*. 2001 Sep 4;104(10):1188–93.

13. Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, et al. A polymer-based, paclitaxel-eluting stent in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):221–31.
14. Sousa JE, Costa MA, Sousa AGMR, Abizaid AC, Seixas AC, Abizaid AS, et al. Two-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up after implantation of sirolimus-eluting stents in human coronary arteries. *Circulation*. 2003 Jan 28;107(3):381–3.
15. van Beusekom HMM, Sorop O, van den Heuvel M, Onuma Y, Duncker DJ, Danser AHJ, et al. Endothelial function rather than endothelial restoration is altered in paclitaxel- as compared to bare metal-, sirolimus and tacrolimus-eluting stents. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2010 May;6(1):117–25.
16. Otsuka F, Nakano M, Ladich E, Kolodgie FD, Virmani R. Pathologic Etiologies of Late and Very Late Stent Thrombosis following First-Generation Drug-Eluting Stent Placement. *Thrombosis*. 2012;2012:608593.
17. Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, et al. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med*. 2007 Mar 8;356(10):1030–9.
18. Onuma Y, Dudek D, Thuesen L, Webster M, Nieman K, Garcia-Garcia HM, et al. Five-year clinical and functional multislice computed tomography angiographic results after coronary implantation of the fully resorbable polymeric everolimus-eluting scaffold in patients with de novo coronary artery disease: the ABSORB cohort A trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2013 Oct;6(10):999–1009.
19. Bangalore S, Kumar S, Fusaro M, Amoroso N, Attubato MJ, Feit F, et al. Short- and long-term outcomes with drug-eluting and bare-metal coronary stents: a mixed-treatment comparison analysis of 117 762 patient-years of follow-up from randomized trials. *Circulation*. 2012 Jun 12;125(23):2873–91.
20. Heublein B, Rohde R, Kaese V, Niemeyer M, Hartung W, Haverich A. Biocorrosion of magnesium alloys: a new principle in cardiovascular implant technology? *Heart*. 2003;89(6):651–656.
21. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, Group TP. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLOS Med*. 2009 Jul;6(7):e1000097.
22. Stone GW, Teirstein PS, Meredith IT, Farah B, Dubois CL, Feldman RL, 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. *J Am Coll Cardiol*. 2011 Apr 19;57(16):1700–8.
23. Saito S, Hagiwara N, Seki A, Igarashi K, Muramatsu T, Yajima J, et al. Japanese and non-Japanese patient outcomes in the PLATINUM randomized trial comparing the PROMUS Element and XIENCE V everolimus-eluting stents. *J Cardiol*. 2014 Aug;64(2):105–12.
24. Meredith IT, Teirstein PS, Bouchard A, Carrié D, Möllmann H, Oldroyd KG, et al. Three-year results comparing platinum-chromium PROMUS element and cobalt-chromium XIENCE V everolimus-eluting stents in de novo coronary artery narrowing (from the PLATINUM Trial). *Am J Cardiol*. 2014 Apr 1;113(7):1117–23.

25. Kelly CR, Teirstein PS, Meredith IT, Farah B, Dubois CL, Feldman RL, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Platinum Chromium Everolimus-Eluting Stents in Coronary Artery Disease: 5-Year Results From the PLATINUM Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2017 11;10(23):2392–400.
26. Fajadet J, Neumann F-J, Hildick-Smith D, Petronio S, Zaman A, Spence M, et al. Twelve-month results of a prospective, multicentre trial to assess the everolimus-eluting coronary stent system (PROMUS Element): the PLATINUM PLUS all-comers randomised trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2017 Jan 20;12(13):1595–604.
27. Gao R, Han Y, Yang Y, Zhang J, Hou Y, Wang H, et al. PLATINUM China: a prospective, randomized investigation of the platinum chromium everolimus-eluting stent in de novo coronary artery lesions. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2015 Mar;85 Suppl 1:716–23.
28. Kereiakes DJ, Cannon LA, Dauber I, Ball M, Bertolet B, Foster M, et al. Long-term follow-up of the platinum chromium TAXUS Element (ION) stent: The PERSEUS Workhorse and Small Vessel trial five-year results. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2015 Nov 15;86(6):994–1001.
29. van Geuns R-JM, Yetgin T, La Manna A, Tamburino C, Souteyrand G, Motreff P, et al. STENTYS Self-Apposing sirolimus-eluting stent in ST-segment elevation myocardial infarction: results from the randomised APPOSITION IV trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2016 Feb;11(11):e1267-1274.
30. Karjalainen PP, Namas W, Ylitalo A, de Bruyne B, Lalmand J, de Belder A, et al. Long-term clinical outcome of titanium-nitride-oxide-coated stents versus everolimus-eluting stents in acute coronary syndrome: Final report of the BASE ACS trial. *Int J Cardiol.* 2016 Nov 1;222:275–80.
31. Karjalainen PP, Niemelä M, Pietilä M, Sia J, de Belder A, Rivero-Crespo F, et al. 4-Year outcome of bioactive stents versus everolimus-eluting stents in acute coronary syndrome. *Scand Cardiovasc J SCJ.* 2016 Aug;50(4):218–23.
32. Pilgrim T, Räber L, Limacher A, Löffel L, Wenaweser P, Cook S, et al. Comparison of titanium-nitride-oxide-coated stents with zotarolimus-eluting stents for coronary revascularization a randomized controlled trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2011 Jun;4(6):672–82.
33. Pilgrim T, Räber L, Limacher A, Wenaweser P, Cook S, Stauffer J-C, et al. Five-year results of a randomised comparison of titanium-nitride-oxide-coated stents with zotarolimus-eluting stents for coronary revascularisation. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2015 Mar;10(11):1284–7.
34. López-Mínguez JR, Nogales-Asensio JM, Doncel-Vecino LJ, Merchán-Herrera A, Pomar-Domingo F, Martínez-Romero P, et al. A randomized study to compare bioactive titanium stents and everolimus-eluting stents in diabetic patients (TITANIC XV): 1-year results. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed.* 2014 Jul;67(7):522–30.
35. Tuomainen PO, Sia J, Namas W, Niemelä M, Airaksinen JKE, Biancari F, et al. Pooled analysis of two randomized trials comparing titanium-nitride-oxide-coated stent versus drug-eluting stent in STEMI. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed.* 2014 Jul;67(7):531–7.

36. Gao R, Yang Y, Han Y, Huo Y, Chen J, Yu B, et al. Bioresorbable Vascular Scaffolds Versus Metallic Stents in Patients With Coronary Artery Disease: ABSORB China Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Dec 1;66(21):2298–309.
37. Serruys PW, Chevalier B, Dudek D, Cequier A, Carrié D, Iniguez A, et al. A bioresorbable everolimus-eluting scaffold versus a metallic everolimus-eluting stent for ischaemic heart disease caused by de-novo native coronary artery lesions (ABSORB II): an interim 1-year analysis of clinical and procedural secondary outcomes from a randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 Jan 3;385(9962):43–54.
38. Chevalier B, Onuma Y, van Boven AJ, Piek JJ, Sabaté M, Helqvist S, et al. Randomised comparison of a bioresorbable everolimus-eluting scaffold with a metallic everolimus-eluting stent for ischaemic heart disease caused by de novo native coronary artery lesions: the 2-year clinical outcomes of the ABSORB II trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Oct 20;12(9):1102–7.
39. Ellis SG, Kereiakes DJ, Metzger DC, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, et al. Everolimus-Eluting Bioresorbable Scaffolds for Coronary Artery Disease. *N Engl J Med*. 2015 Nov 12;373(20):1905–15.
40. Kereiakes DJ, Ellis SG, Metzger C, Caputo RP, Rizik DG, Teirstein PS, et al. 3-Year Clinical Outcomes With Everolimus-Eluting Bioresorbable Coronary Scaffolds: The ABSORB III Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Dec 12;70(23):2852–62.
41. Kimura T, Kozuma K, Tanabe K, Nakamura S, Yamane M, Muramatsu T, et al. A randomized trial evaluating everolimus-eluting Absorb bioresorbable scaffolds vs. everolimus-eluting metallic stents in patients with coronary artery disease: ABSORB Japan. *Eur Heart J*. 2015 Dec 14;36(47):3332–42.
42. Onuma Y, Sotomi Y, Shiomi H, Ozaki Y, Namiki A, Yasuda S, et al. Two-year clinical, angiographic, and serial optical coherence tomographic follow-up after implantation of an everolimus-eluting bioresorbable scaffold and an everolimus-eluting metallic stent: insights from the randomised ABSORB Japan trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Oct 20;12(9):1090–101.
43. Wykrzykowska JJ, Kraak RP, Hofma SH, van der Schaaf RJ, Arkenbout EK, IJsselmuiden AJ, et al. Bioresorbable Scaffolds versus Metallic Stents in Routine PCI. *N Engl J Med*. 2017 15;376(24):2319–28.
44. Katagiri Y, Onuma Y, Asano T, Iniguez A, Jensen LO, Cequier A, et al. Three-year follow-up of the randomised comparison between an everolimus-eluting bioresorbable scaffold and a durable polymer everolimus-eluting metallic stent in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (TROFI II trial). *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2018 Dec 7;14(11):e1224–6.
45. Serruys PW, Chevalier B, Sotomi Y, Cequier A, Carrié D, Piek JJ, et al. Comparison of an everolimus-eluting bioresorbable scaffold with an everolimus-eluting metallic stent for the treatment of coronary artery stenosis (ABSORB II): a 3 year, randomised, controlled, single-blind, multicentre clinical trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 19;388(10059):2479–91.
46. Chevalier B, Cequier A, Dudek D, Haude M, Carrié D, Sabaté M, et al. Four-year follow-up of the randomised comparison between an everolimus-eluting bioresorbable scaffold and an everolimus-eluting metallic stent for the treatment of coronary artery stenosis (ABSORB II

- Trial). *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2018 20;13(13):1561–4.
47. Han Y, Xu B, Fu G, Wang X, Xu K, Jin C, et al. A Randomized Trial Comparing the NeoVas Sirolimus-Eluting Bioresorbable Scaffold and Metallic Everolimus-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2018 12;11(3):260–72.
  48. de Ribamar Costa J, Abizaid A, Bartorelli AL, Whitbourn R, Jepson N, Perin M, et al. One-year clinical outcomes of patients treated with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds versus everolimus-eluting metallic stents: a propensity score comparison of patients enrolled in the ABSORB EXTEND and SPIRIT trials. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Nov 20;12(10):1255–62.
  49. Arroyo D, Gendre G, Schukraft S, Kallinikou Z, Müller O, Baeriswyl G, et al. Comparison of everolimus- and biolimus-eluting coronary stents with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds: Two-year clinical outcomes of the EVERBIO II trial. *Int J Cardiol*. 2017 Sep 15;243:121–5.
  50. Campos CM, Caixeta A, Franken M, Bartorelli AL, Whitbourn RJ, Wu C-J, et al. Risk and timing of clinical events according to diabetic status of patients treated with everolimus-eluting bioresorbable vascular scaffolds versus everolimus-eluting stent: 2-year results from a propensity score matched comparison of ABSORB EXTEND and SPIRIT trials. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2018 15;91(3):387–95.
  51. Byrne RA, Kastrati A, Kufner S, Massberg S, Birkmeier KA, Laugwitz K-L, et al. Randomized, non-inferiority trial of three limus agent-eluting stents with different polymer coatings: the Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Test Efficacy of 3 Limus-Eluting Stents (ISAR-TEST-4) Trial. *Eur Heart J*. 2009 Oct;30(20):2441–9.
  52. Kufner S, Byrne RA, Valeskini M, Schulz S, Ibrahim T, Hoppmann P, et al. Five-year outcomes from a trial of three limus-eluting stents with different polymer coatings in patients with coronary artery disease: final results from the ISAR-TEST 4 randomised trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Mar;11(12):1372–9.
  53. Han Y, Xu B, Jing Q, Lu S, Yang L, Xu K, et al. A randomized comparison of novel biodegradable polymer- and durable polymer-coated cobalt-chromium sirolimus-eluting stents. *JACC Cardiovasc Interv*. 2014 Dec;7(12):1352–60.
  54. Song L, Li J, Guan C, Jing Q, Lu S, Yang L, et al. Randomized comparison of novel biodegradable polymer and durable polymer-coated cobalt-chromium sirolimus-eluting stents: Three-Year Outcomes of the I-LOVE-IT 2 Trial. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2018 15;91(S1):608–16.
  55. Kereiakes DJ, Meredith IT, Windecker S, Lee Jobe R, Mehta SR, Sarembock IJ, et al. Efficacy and safety of a novel bioabsorbable polymer-coated, everolimus-eluting coronary stent: the EVOLVE II Randomized Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Apr;8(4).
  56. Han Y, Liu H, Yang Y, Zhang J, Xu K, Fu G, et al. A randomised comparison of biodegradable polymer- and permanent polymer-coated platinum-chromium everolimus-eluting coronary stents in China: the EVOLVE China study. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2017 Nov 20;13(10):1210–7.

57. Pilgrim T, Piccolo R, Heg D, Roffi M, Tüller D, Vuillimienet A, et al. Biodegradable polymer sirolimus-eluting stents versus durable polymer everolimus-eluting stents for primary percutaneous coronary revascularisation of acute myocardial infarction. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Dec 10;12(11):e1343–54.
58. Pilgrim T, Heg D, Roffi M, Tüller D, Muller O, Vuillimienet A, et al. Ultrathin strut biodegradable polymer sirolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent for percutaneous coronary revascularisation (BIOSCIENCE): a randomised, single-blind, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2014 Dec 13;384(9960):2111–22.
59. Zbinden R, Piccolo R, Heg D, Roffi M, Kurz DJ, Muller O, et al. Ultrathin Strut Biodegradable Polymer Sirolimus-Eluting Stent Versus Durable-Polymer Everolimus-Eluting Stent for Percutaneous Coronary Revascularization: 2-Year Results of the BIOSCIENCE Trial. *J Am Heart Assoc*. 2016 Mar 15;5(3):e003255.
60. Pilgrim T, Piccolo R, Heg D, Roffi M, Tüller D, Muller O, et al. Ultrathin-strut, biodegradable-polymer, sirolimus-eluting stents versus thin-strut, durable-polymer, everolimus-eluting stents for percutaneous coronary revascularisation: 5-year outcomes of the BIOSCIENCE randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2018 01;392(10149):737–46.
61. Franzone A, Pilgrim T, Heg D, Roffi M, Tüller D, Vuillimienet A, et al. Clinical outcomes according to diabetic status in patients treated with biodegradable polymer sirolimus-eluting stents versus durable polymer everolimus-eluting stents: prespecified subgroup analysis of the BIOSCIENCE trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Jun;8(6).
62. Lansky AJ, Kastrati A, Edelman ER, Parise H, Ng VG, Ormiston J, et al. Comparison of the Absorbable Polymer Sirolimus-Eluting Stent (MiStent) to the Durable Polymer Everolimus-Eluting Stent (Xience) (from the DESSOLVE I/II and ISAR-TEST-4 Studies). *Am J Cardiol*. 2016 Feb 15;117(4):532–8.
63. Kandzari DE, Mauri L, Koolen JJ, Massaro JM, Doros G, Garcia-Garcia HM, et al. Ultrathin, bioresorbable polymer sirolimus-eluting stents versus thin, durable polymer everolimus-eluting stents in patients undergoing coronary revascularisation (BIOFLOW V): a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2017 Oct 21;390(10105):1843–52.
64. Raungaard B, Jensen LO, Tilsted H-H, Christiansen EH, Maeng M, Terkelsen CJ, et al. Zotarolimus-eluting durable-polymer-coated stent versus a biolimus-eluting biodegradable-polymer-coated stent in unselected patients undergoing percutaneous coronary intervention (SORT OUT VI): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2015 Apr 18;385(9977):1527–35.
65. Raungaard B, Christiansen EH, Bøtker HE, Hansen HS, Ravkilde J, Thuesen L, et al. Comparison of Durable-Polymer Zotarolimus-Eluting and Biodegradable-Polymer Biolimus-Eluting Coronary Stents in Patients With Coronary Artery Disease: 3-Year Clinical Outcomes in the Randomized SORT OUT VI Trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017 13;10(3):255–64.
66. Vlachojannis GJ, Puricel S, Natsuaki M, Morimoto T, Smits PC, Kimura T. Biolimus-eluting versus everolimus-eluting stents in coronary artery disease: a pooled analysis from the NEXT (NOBORI biolimus-eluting versus XIENCE/PROMUS everolimus-eluting stent) and COMPARE II (Abluminal biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent) randomised trials. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2017 Mar 20;12(16):1970–7.

67. El-Hayek G, Bangalore S, Casso Dominguez A, Devireddy C, Jaber W, Kumar G, et al. Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials Comparing Biodegradable Polymer Drug-Eluting Stent to Second-Generation Durable Polymer Drug-Eluting Stents. *JACC Cardiovasc Interv.* 2017 13;10(5):462–73.
68. Stefanini GG, Kalesan B, Serruys PW, Heg D, Buszman P, Linke A, et al. Long-term clinical outcomes of biodegradable polymer biolimus-eluting stents versus durable polymer sirolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease (LEADERS): 4 year follow-up of a randomised non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl.* 2011 Dec 3;378(9807):1940–8.
69. Zhang Y-J, Iqbal J, Windecker S, Linke A, Antoni D, Sohn HY, et al. Biolimus-eluting stent with biodegradable polymer improves clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Heart Br Card Soc.* 2015 Feb;101(4):271–8.
70. Grundeken MJ, Wykrzykowska JJ, Ishibashi Y, Garg S, de Vries T, Garcia-Garcia HM, et al. First generation versus second generation drug-eluting stents for the treatment of bifurcations: 5-year follow-up of the LEADERS all-comers randomized trial. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2016 Jun;87(7):E248-260.
71. Ghione M, Wykrzykowska JJ, Windecker S, Serruys PW, Buszman P, Linke A, et al. Five-year outcomes of chronic total occlusion treatment with a biolimus A9-eluting biodegradable polymer stent versus a sirolimus-eluting permanent polymer stent in the LEADERS all-comers trial. *Cardiol J.* 2016;23(6):626–36.
72. Smits PC, Hofma S, Togni M, Vázquez N, Valdés M, Voudris V, et al. Abluminal biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent (COMPARE II): a randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl.* 2013 Feb 23;381(9867):651–60.
73. Vlachojannis GJ, Smits PC, Hofma SH, Togni M, Vázquez N, Valdés M, et al. Long-term clinical outcomes of biodegradable polymer biolimus-eluting stents versus durable polymer everolimus-eluting stents in patients with coronary artery disease: three-year follow-up of the COMPARE II (Abluminal biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent) trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2015 Jul;11(3):272–9.
74. Stiermaier T, Heinz A, Schloma D, Kleinertz K, Dänschel W, Erbs S, et al. Five-year clinical follow-up of a randomized comparison of a polymer-free sirolimus-eluting stent versus a polymer-based paclitaxel-eluting stent in patients with diabetes mellitus (LIPSIA Yukon trial). *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2014 Feb 15;83(3):418–24.
75. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Kadota K, Muramatsu T, Nakagawa Y, et al. Biodegradable polymer biolimus-eluting stent versus durable polymer everolimus-eluting stent: a randomized, controlled, noninferiority trial. *J Am Coll Cardiol.* 2013 Jul 16;62(3):181–90.
76. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Shiomi H, Kimura T. Two-year outcome of a randomized trial comparing second-generation drug-eluting stents using biodegradable or durable polymer. *JAMA.* 2014 May;311(20):2125–7.
77. Natsuaki M, Kozuma K, Morimoto T, Kadota K, Muramatsu T, Nakagawa Y, et al. Final 3-Year Outcome of a Randomized Trial Comparing Second-Generation Drug-Eluting Stents Using Either Biodegradable Polymer or Durable Polymer: NOBORI Biolimus-Eluting Versus XIENCE/PROMUS Everolimus-Eluting Stent Trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015 Oct;8(10).

78. Christiansen EH, Jensen LO, Thayssen P, Tilsted H-H, Krusell LR, Hansen KN, et al. Biolimus-eluting biodegradable polymer-coated stent versus durable polymer-coated sirolimus-eluting stent in unselected patients receiving percutaneous coronary intervention (SORT OUT V): a randomised non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2013 Feb 23;381(9867):661–9.
79. Jakobsen L, Christiansen EH, Maeng M, Hansen KN, Kristensen SD, Bøtker HE, et al. Final five-year outcomes after implantation of biodegradable polymer-coated biolimus-eluting stents versus durable polymer-coated sirolimus-eluting stents. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2017 Dec 20;13(11):1336–44.
80. Kaiser C, Galatius S, Jeger R, Gilgen N, Skov Jensen J, Naber C, et al. Long-term efficacy and safety of biodegradable-polymer biolimus-eluting stents: main results of the Basel Stent Kosten-Effektivitäts Trial-PROspective Validation Examination II (BASKET-PROVE II), a randomized, controlled noninferiority 2-year outcome trial. *Circulation*. 2015 Jan 6;131(1):74–81.
81. Lee J-Y, Park D-W, Kim Y-H, Ahn J-M, Kim W-J, Kang S-J, et al. Comparison of biolimus A9-eluting (Nobori) and everolimus-eluting (Promus Element) stents in patients with de novo native long coronary artery lesions: a randomized Long Drug-Eluting Stent V trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2014 Jun;7(3):322–9.
82. Zhang Q, Qiu JP, Kirtane AJ, Zhu TQ, Zhang RY, Yang ZK, et al. Comparison of biodegradable polymer versus durable polymer sirolimus-eluting stenting in patients with acute st-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the RESOLVE study. *J Intervent Cardiol*. 2014 Apr;27(2):131–41.
83. Windecker S, Haude M, Neumann F-J, Stangl K, Witzenbichler B, Slagboom T, et al. Comparison of a novel biodegradable polymer sirolimus-eluting stent with a durable polymer everolimus-eluting stent: results of the randomized BIOFLOW-II trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Feb;8(2):e001441.
84. Kim B-K, Shin D-H, Hong M-K, Park HS, Rha S-W, Mintz GS, et al. Clinical Impact of Intravascular Ultrasound-Guided Chronic Total Occlusion Intervention With Zotarolimus-Eluting Versus Biolimus-Eluting Stent Implantation: Randomized Study. *Circ Cardiovasc Interv*. 2015 Jul;8(7):e002592.
85. Chevalier B, Wijns W, Silber S, Garcia E, Serra A, Paunovic D, et al. Five-year clinical outcome of the Nobori drug-eluting coronary stent system in the treatment of patients with coronary artery disease: final results of the NOBORI 1 trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2015 Sep;11(5):549–54.
86. von Birgelen C, Kok MM, van der Heijden LC, Danse PW, Schotborgh CE, Scholte M, et al. Very thin strut biodegradable polymer everolimus-eluting and sirolimus-eluting stents versus durable polymer zotarolimus-eluting stents in allcomers with coronary artery disease (BIO-RESORT): a three-arm, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2016 26;388(10060):2607–17.
87. Wöhrle J, Markovic S, Rottbauer W, Muramatsu T, Kadota K, Vázquez-González N, et al. Bioresorbable polymer sirolimus-eluting coronary stent compared with permanent polymer everolimus-eluting coronary stent implantation for treatment of small vessel coronary artery disease: CENTURY II trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Jun 12;12(2):e167-174.



88. Jiménez VA, Iñiguez A, Baz JA, Valdés M, Ortiz A, Vuilliomenet A, et al. A randomized comparison of novel bioresorbable polymer sirolimus-eluting stent and durable polymer everolimus-eluting stent in patients with acute coronary syndromes: The CENTURY II high risk ACS substudy. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv*. 2016 Sep;17(6):355–61.
89. Verheye S, Khattab AA, Carrie D, Stella P, Slagboom T, Bartunek J, et al. Direct implantation of rapamycin-eluting stents with bioresorbable drug carrier technology utilising the Svelte coronary stent-on-a-wire: the DIRECT II study. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Aug 5;12(5):e615-622.
90. Wijns W, Suttorp MJ, Zagozdzon L, Morice M-C, McClean D, Stella P, et al. Evaluation of a crystalline sirolimus-eluting coronary stent with a bioabsorbable polymer designed for rapid dissolution: two-year outcomes from the DESSOLVE I and II trials. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Jun 20;12(3):352–5.
91. Xu B, Gao R, Yang Y, Cao X, Qin L, Li Y, et al. Biodegradable Polymer-Based Sirolimus-Eluting Stents With Differing Elution and Absorption Kinetics: The PANDA III Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2016 May 17;67(19):2249–58.
92. Guan C, Xu B, Qiao S, Qin L, Li Y, Li Z, et al. Comparison of two biodegradable-polymer-based sirolimus-eluting stents with varying elution and absorption kinetics in patients with acute myocardial infarction: A subgroup analysis of the PANDA III trial. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2017 Mar;89(S1):520–7.
93. Vlachojannis GJ, Smits PC, Hofma SH, Togni M, Vázquez N, Valdés M, et al. Biodegradable Polymer Biolimus-Eluting Stents Versus Durable Polymer Everolimus-Eluting Stents in Patients With Coronary Artery Disease: Final 5-Year Report From the COMPARE II Trial (Abluminal Biodegradable Polymer Biolimus-Eluting Stent Versus Durable Polymer Everolimus-Eluting Stent). *JACC Cardiovasc Interv*. 2017 26;10(12):1215–21.
94. Kang S-H, Chung W-Y, Lee JM, Park J-J, Yoon C-H, Suh J-W, et al. Angiographic outcomes of Orsiro biodegradable polymer sirolimus-eluting stents and Resolute Integrity durable polymer zotarolimus-eluting stents: results of the ORIENT trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2017 Jan 20;12(13):1623–31.
95. de Winter RJ, Katagiri Y, Asano T, Milewski KP, Lurz P, Buszman P, et al. A sirolimus-eluting bioabsorbable polymer-coated stent (MiStent) versus an everolimus-eluting durable polymer stent (Xience) after percutaneous coronary intervention (DESSOLVE III): a randomised, single-blind, multicentre, non-inferiority, phase 3 trial. *Lancet Lond Engl*. 2018 03;391(10119):431–40.
96. Zhang Y, Chen F, Muramatsu T, Xu B, Li Z, Ge J, et al. Nine-month angiographic and two-year clinical follow-up of polymer-free sirolimus-eluting stent versus durable-polymer sirolimus-eluting stent for coronary artery disease: the Nano randomized trial. *Chin Med J (Engl)*. 2014;127(11):2153–8.
97. Massberg S, Byrne RA, Kastrati A, Schulz S, Pache J, Hausleiter J, et al. Polymer-free sirolimus- and probucol-eluting versus new generation zotarolimus-eluting stents in coronary artery disease: the Intracoronary Stenting and Angiographic Results: Test Efficacy of Sirolimus- and Probucol-Eluting versus Zotarolimus-eluting Stents (ISAR-TEST 5) trial. *Circulation*. 2011 Aug 2;124(5):624–32.

98. Kufner S, Sorges J, Mehilli J, Cassese S, Repp J, Wiebe J, et al. Randomized Trial of Polymer-Free Sirolimus- and Probucoel-Eluting Stents Versus Durable Polymer Zotarolimus-Eluting Stents: 5-Year Results of the ISAR-TEST-5 Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2016 Apr 25;9(8):784–92.
99. Harada Y, Colleran R, Kufner S, Giacoppo D, Rheude T, Michel J, et al. Five-year clinical outcomes in patients with diabetes mellitus treated with polymer-free sirolimus- and probucoleluting stents versus second-generation zotarolimus-eluting stents: a subgroup analysis of a randomized controlled trial. *Cardiovasc Diabetol.* 2016 01;15(1):124.
100. Colleran R, Kufner S, Harada Y, Giacoppo D, Cassese S, Repp J, et al. Five-year follow-up of polymer-free sirolimus- and probucoleluting stents versus new generation zotarolimus-eluting stents in patients presenting with st-elevation myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2017 Feb 15;89(3):367–74.
101. Costa RA, Abizaid A, Mehran R, Schofer J, Schuler GC, Hauptmann KE, et al. Polymer-Free Biolimus A9-Coated Stents in the Treatment of De Novo Coronary Lesions: 4- and 12-Month Angiographic Follow-Up and Final 5-Year Clinical Outcomes of the Prospective, Multicenter BioFreedom FIM Clinical Trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2016 Jan 11;9(1):51–64.
102. Windecker S, Remondino A, Eberli FR, Jüni P, Räber L, Wenaweser P, et al. Sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2005 Aug 18;353(7):653–62.
103. Nakamura M, Muramatsu T, Yokoi H, Okada H, Ochiai M, Suwa S, et al. Outcomes of the largest multi-center trial stratified by the presence of diabetes mellitus comparing sirolimus-eluting stents (SES) and paclitaxel-eluting stents (PES) in patients with coronary artery disease. The Japan drug-eluting stents evaluation: a randomized trial (J-DESSERT). *Cardiovasc Interv Ther.* 2015 Apr;30(2):103–14.
104. Yamaji K, Räber L, Zanchin T, Spitzer E, Zanchin C, Pilgrim T, et al. Ten-year clinical outcomes of first-generation drug-eluting stents: the Sirolimus-Eluting vs. Paclitaxel-Eluting Stents for Coronary Revascularization (SIRTAX) VERY LATE trial. *Eur Heart J.* 2016 Dec 1;37(45):3386–95.
105. Galløe AM, Kelbæk H, Thuesen L, Hansen HS, Ravkilde J, Hansen PR, et al. 10-Year Clinical Outcome After Randomization to Treatment by Sirolimus- or Paclitaxel-Eluting Coronary Stents. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Feb 14;69(6):616–24.
106. Galløe AM, Thuesen L, Kelbaek H, Thayssen P, Rasmussen K, Hansen PR, et al. Comparison of paclitaxel- and sirolimus-eluting stents in everyday clinical practice: the SORT OUT II randomized trial. *JAMA.* 2008 Jan 30;299(4):409–16.
107. Bligaard N, Thuesen L, Saunamäki K, Thayssen P, Aarøe J, Hansen PR, et al. Similar five-year outcome with paclitaxel- and sirolimus-eluting coronary stents. *Scand Cardiovasc J SCJ.* 2014 Jun;48(3):148–55.
108. Mehilli J, Kastrati A, Byrne RA, Bruskin O, Iijima R, Schulz S, et al. Paclitaxel- versus sirolimus-eluting stents for unprotected left main coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009 May 12;53(19):1760–8.
109. Kufner S, Byrne RA, de Waha A, Schulz S, Joner M, Laugwitz K-L, et al. Sirolimus-eluting versus paclitaxel-eluting stents in diabetic and non-diabetic patients within sirolimus-eluting stent restenosis: results from the ISAR-DESIRE 2 trial. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv.* 2014 Mar;15(2):69–75.

110. Otsuka M, Yokoi H, Matsuyama Y, Hayashi Y, Shiode N, Masaoka Y, et al. Comparison of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents in patients with moderate renal insufficiency: results from the J-DESSERT trial. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv*. 2014 Oct;15(6–7):323–8.
111. Nakamura M, Muramatsu T, Yokoi H, Okada H, Ochiai M, Suwa S, et al. Three-year follow-up outcomes of SES and PES in a randomized controlled study stratified by the presence of diabetes mellitus: J-DESSERT trial. *Int J Cardiol*. 2016 Apr 1;208:4–12.
112. Kaul U, Bangalore S, Seth A, Arambam P, Abhaichand RK, Abhaychand RK, et al. Paclitaxel-Eluting versus Everolimus-Eluting Coronary Stents in Diabetes. *N Engl J Med*. 2015 Oct 29;373(18):1709–19.
113. Bangalore S, Bhagwat A, Pinto B, Goel PK, Jagtap P, Sathe S, et al. Percutaneous Coronary Intervention in Patients With Insulin-Treated and Non-Insulin-Treated Diabetes Mellitus: Secondary Analysis of the TUXEDO Trial. *JAMA Cardiol*. 2016 01;1(3):266–73.
114. Kaul U, Bhagwat A, Pinto B, Goel PK, Jagtap P, Sathe S, et al. Paclitaxel-eluting stents versus everolimus-eluting coronary stents in a diabetic population: two-year follow-up of the TUXEDO-India trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2017 Nov 20;13(10):1194–201.
115. Kedhi E, Joesoef KS, McFadden E, Wassing J, van Mieghem C, Goedhart D, et al. Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Jan 16;375(9710):201–9.
116. Smits PC, Vlachojannis GJ, McFadden EP, Roybaards K-J, Wassing J, Joesoef KS, et al. Final 5-Year Follow-Up of a Randomized Controlled Trial of Everolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents for Coronary Revascularization in Daily Practice: The COMPARE Trial (A Trial of Everolimus-Eluting Stents and Paclitaxel Stents for Coronary Revascularization in Daily Practice). *JACC Cardiovasc Interv*. 2015 Aug 17;8(9):1157–65.
117. Maeng M, Baranauskas A, Christiansen EH, Kaltoft A, Holm NR, Krusell LR, et al. A 10-month angiographic and 4-year clinical outcome of everolimus-eluting versus sirolimus-eluting coronary stents in patients with diabetes mellitus (the DiabeDES IV randomized angiography trial). *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv*. 2015 Dec 1;86(7):1161–7.
118. Hofma SH, Brouwer J, Velders MA, van't Hof AWJ, Smits PC, Queré M, et al. Second-generation everolimus-eluting stents versus first-generation sirolimus-eluting stents in acute myocardial infarction. 1-year results of the randomized XAMI (XienceV Stent vs. Cypher Stent in Primary PCI for Acute Myocardial Infarction) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Jul 31;60(5):381–7.
119. Hofma SH, Smits PC, Brouwer J, Velders MA, van 't Hof AWJ, Queré M, et al. Long-term follow-up of second-generation everolimus-eluting stents versus first-generation sirolimus-eluting stents in acute myocardial infarction: three-year results of the XAMI trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2015 Mar;10(11):1280–3.
120. Di Lorenzo E, Sauro R, Varricchio A, Capasso M, Lanzillo T, Manganelli F, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting stents and sirolimus-eluting stents in patients with ST elevation myocardial infarction: RACES-MI trial. *JACC Cardiovasc Interv*. 2014 Aug;7(8):849–56.

121. Di Lorenzo E, Sauro R, Capasso M, Lanni F, Lanzillo T, Carbone G, et al. Long-term results of the randomized comparison of everolimus-eluting stents and sirolimus-eluting stent in patients with ST elevation myocardial infarction (RACES-MI trial). *Int J Cardiol.* 2016 Jan 1;202:177–82.
122. Jensen LO, Thayssen P, Hansen HS, Christiansen EH, Tilsted HH, Krusell LR, et al. Randomized comparison of everolimus-eluting and sirolimus-eluting stents in patients treated with percutaneous coronary intervention: the Scandinavian Organization for Randomized Trials with Clinical Outcome IV (SORT OUT IV). *Circulation.* 2012 Mar 13;125(10):1246–55.
123. Jensen LO, Thayssen P, Christiansen EH, Maeng M, Ravkilde J, Hansen KN, et al. Safety and Efficacy of Everolimus- Versus Sirolimus-Eluting Stents: 5-Year Results From SORT OUT IV. *J Am Coll Cardiol.* 2016 Feb 23;67(7):751–62.
124. Cassese S, Kufner S, Xhepa E, Byrne RA, Kreutzer J, Ibrahim T, et al. Three-year efficacy and safety of new- versus early-generation drug-eluting stents for unprotected left main coronary artery disease insights from the ISAR-LEFT MAIN and ISAR-LEFT MAIN 2 trials. *Clin Res Cardiol Off J Ger Card Soc.* 2016 Jul;105(7):575–84.
125. Kaiser C, Galatius S, Erne P, Eberli F, Alber H, Rickli H, et al. Drug-eluting versus bare-metal stents in large coronary arteries. *N Engl J Med.* 2010 Dec 9;363(24):2310–9.
126. Pedersen SH, Pfisterer M, Kaiser C, Jensen JS, Alber H, Rickenbacher P, et al. Drug-eluting stents and bare metal stents in patients with NSTEMI-ACS: 2-year outcome from the randomised BASKET-PROVE trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2014 May;10(1):58–64.
127. Kimura T, Morimoto T, Natsuaki M, Shiomi H, Igarashi K, Kadota K, et al. Comparison of everolimus-eluting and sirolimus-eluting coronary stents: 1-year outcomes from the Randomized Evaluation of Sirolimus-eluting Versus Everolimus-eluting stent Trial (RESET). *Circulation.* 2012 Sep 4;126(10):1225–36.
128. Shiomi H, Kozuma K, Morimoto T, Igarashi K, Kadota K, Tanabe K, et al. Long-term clinical outcomes after everolimus- and sirolimus-eluting coronary stent implantation: final 3-year follow-up of the Randomized Evaluation of Sirolimus-Eluting Versus Everolimus-Eluting Stent Trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2014 Jun;7(3):343–54.
129. Jensen LO, Thayssen P, Maeng M, Christiansen EH, Ravkilde J, Hansen KN, et al. Three-year outcomes after revascularization with everolimus- and sirolimus-eluting stents from the SORT OUT IV trial. *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Aug;7(8):840–8.
130. Jeger R, Pfisterer M, Pfister O, Rickenbacher P, Handke M, Gilgen N, et al. First-generation paclitaxel- vs. second-generation zotarolimus-eluting stents in small coronary arteries: the BASKET-SMALL Pilot Study. *Postepy W Kardiologii Interwencyjnej Adv Interv Cardiol.* 2016;12(4):314–20.
131. Camenzind E, Wijns W, Mauri L, Kurowski V, Parikh K, Gao R, et al. Stent thrombosis and major clinical events at 3 years after zotarolimus-eluting or sirolimus-eluting coronary stent implantation: a randomised, multicentre, open-label, controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2012 Oct 20;380(9851):1396–405.
132. Wijns W, Steg PG, Mauri L, Kurowski V, Parikh K, Gao R, et al. Endeavour zotarolimus-eluting stent reduces stent thrombosis and improves clinical outcomes compared with cypher

- sirolimus-eluting stent: 4-year results of the PROTECT randomized trial. *Eur Heart J*. 2014 Oct 21;35(40):2812–20.
133. Rasmussen K, Maeng M, Kaltoft A, Thayssen P, Kelbaek H, Tilsted HH, et al. Efficacy and safety of zotarolimus-eluting and sirolimus-eluting coronary stents in routine clinical care (SORT OUT III): a randomised controlled superiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2010 Mar 27;375(9720):1090–9.
  134. Maeng M, Tilsted HH, Jensen LO, Krusell LR, Kaltoft A, Kelbæk H, et al. Differential clinical outcomes after 1 year versus 5 years in a randomised comparison of zotarolimus-eluting and sirolimus-eluting coronary stents (the SORT OUT III study): a multicentre, open-label, randomised superiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2014 Jun 14;383(9934):2047–56.
  135. Van den Branden BJL, Teeuwen K, Koolen JJ, van der Schaaf RJ, Henriques JPS, Tijssen JGP, et al. Primary Stenting of Totally Occluded Native Coronary Arteries III (PRISON III): a randomised comparison of sirolimus-eluting stent implantation with zotarolimus-eluting stent implantation for the treatment of total coronary occlusions. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2013 Nov;9(7):841–53.
  136. Teeuwen K, Van den Branden BJL, Koolen JJ, van der Schaaf RJ, Henriques JPS, Tijssen JGP, et al. Three-year clinical outcome in the Primary Stenting of Totally Occluded Native Coronary Arteries III (PRISON III) trial: a randomised comparison between sirolimus-eluting stent implantation and zotarolimus-eluting stent implantation for the treatment of total coronary occlusions. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2015 Mar;10(11):1272–5.
  137. Serruys PW, Silber S, Garg S, van Geuns RJ, Richardt G, Buszman PE, et al. Comparison of zotarolimus-eluting and everolimus-eluting coronary stents. *N Engl J Med*. 2010 Jul 8;363(2):136–46.
  138. von Birgelen C, Basalus MWZ, Tandjung K, van Houwelingen KG, Stoel MG, Louwerenburg JHW, et al. A randomized controlled trial in second-generation zotarolimus-eluting Resolute stents versus everolimus-eluting Xience V stents in real-world patients: the TWENTE trial. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Apr 10;59(15):1350–61.
  139. Mehilli J, Richardt G, Valgimigli M, Schulz S, Singh A, Abdel-Wahab M, et al. Zotarolimus- versus everolimus-eluting stents for unprotected left main coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013 Dec 3;62(22):2075–82.
  140. von Birgelen C, Sen H, Lam MK, Danse PW, Jessurun GAJ, Hautvast RWM, et al. Third-generation zotarolimus-eluting and everolimus-eluting stents in all-comer patients requiring a percutaneous coronary intervention (DUTCH PEERS): a randomised, single-blind, multicentre, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2014 Feb 1;383(9915):413–23.
  141. Park KW, Kang S-H, Kang H-J, Koo B-K, Park B-E, Cha KS, et al. A randomized comparison of platinum chromium-based everolimus-eluting stents versus cobalt chromium-based Zotarolimus-Eluting stents in all-comers receiving percutaneous coronary intervention: HOST-ASSURE (harmonizing optimal strategy for treatment of coronary artery stenosis-safety & effectiveness of drug-eluting stents & anti-platelet regimen), a randomized, controlled, noninferiority trial. *J Am Coll Cardiol*. 2014 Jul 1;63(25 Pt A):2805–16.
  142. Valgimigli M, Tebaldi M, Borghesi M, Vranckx P, Campo G, Tumscitz C, et al. Two-year outcomes after first- or second-generation drug-eluting or bare-metal stent implantation in all-comer patients undergoing percutaneous coronary intervention: a pre-specified analysis from the

- PRODIGY study (PROlonging Dual Antiplatelet Treatment After Grading stent-induced Intimal hyperplasia study). *JACC Cardiovasc Interv.* 2014 Jan;7(1):20–8.
143. Taniwaki M, Stefanini GG, Silber S, Richardt G, Vranckx P, Serruys PW, 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). *J Am Coll Cardiol.* 2014 Apr 29;63(16):1617–25.
  144. Iqbal J, Serruys PW, Silber S, Kelbaek H, Richardt G, Morel M-A, et al. Comparison of zotarolimus- and everolimus-eluting coronary stents: final 5-year report of the RESOLUTE all-comers trial. *Circ Cardiovasc Interv.* 2015 Jun;8(6):e002230.
  145. Di Mario C, Serruys PW, Silber S, Lu S, Wang W, Widimský P, et al. Long-term outcomes after Resolute zotarolimus-eluting stent implantation in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction: insights from the RESOLUTE All Comers Trial and the RESOLUTE Global Clinical Trial Program. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2016 Nov 20;12(10):1207–14.
  146. Sen H, Lam MK, Tandjung K, Löwik MM, Stoel MG, de Man FHAF, et al. Complex patients treated with zotarolimus-eluting resolute and everolimus-eluting Xience V stents in the randomized TWENTE trial: comparison of 2-year clinical outcome. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2015 Jan 1;85(1):74–81.
  147. Löwik MM, Lam MK, Sen H, Tandjung K, van Houwelingen KG, de Man FHAF, et al. Safety of second-generation drug-eluting stents three years after randomised use in the TWENTE trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2015 Mar;10(11):1276–9.
  148. Lam MK, Sen H, van Houwelingen KG, Löwik MM, van der Heijden LC, Kok MM, et al. Three-year clinical outcome of patients with bifurcation treatment with second-generation Resolute and Xience V stents in the randomized TWENTE trial. *Am Heart J.* 2015 Jan;169(1):69–77.
  149. Sen H, Lam MK, Löwik MM, Danse PW, Jessurun GAJ, van Houwelingen KG, et al. Clinical Events and Patient-Reported Chest Pain in All-Comers Treated With Resolute Integrity and Promus Element Stents: 2-Year Follow-Up of the DUTCH PEERS (DUrable Polymer-Based STent CHallenge of Promus ElemEnt Versus ReSolute Integrity) Randomized Trial (TWENTE II). *JACC Cardiovasc Interv.* 2015 Jun;8(7):889–99.
  150. van Houwelingen KG, Lam MK, Löwik MM, Danse PW, Tjon Joe Gin RM, Jessurun GA, et al. Outcome After Myocardial Infarction Treated With Resolute Integrity and Promus Element Stents: Insights From the DUTCH PEERS (TWENTE II) Randomized Trial. *Rev Espanola Cardiol Engl Ed.* 2016 Dec;69(12):1152–9.
  151. van der Heijden LC, Kok MM, Löwik MM, Danse PW, Jessurun GAJ, Hautvast RWM, et al. Three-year safety and efficacy of treating all-comers with newer-generation Resolute Integrity or PROMUS Element stents in the randomised DUTCH PEERS (TWENTE II) trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2017 Apr 20;12(17):2128–31.
  152. van der Heijden LC, Kok MM, Löwik MM, Danse PW, Jessurun GAJ, Hartmann M, et al. Three-Year Clinical Outcome of Patients with Coronary Disease and Increased Event Risk Treated with Newer-Generation Drug-Eluting Stents: From the Randomized DUTCH PEERS Trial. *Cardiology.* 2017;137(4):207–17.

153. Jensen LO, Maeng M, Raungaard B, Hansen KN, Kahlert J, Jensen SE, et al. Two-year outcome after biodegradable polymer sirolimus- and biolimus-eluting coronary stents (from the randomised SORT OUT VII trial). *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2018 20;13(13):1587–90.
154. Jensen LO, Thayssen P, Maeng M, Ravkilde J, Krusell LR, Raungaard B, et al. Randomized Comparison of a Biodegradable Polymer Ultrathin Strut Sirolimus-Eluting Stent With a Biodegradable Polymer Biolimus-Eluting Stent in Patients Treated With Percutaneous Coronary Intervention: The SORT OUT VII Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2016;9(7).
155. Lemos PA, Abizaid AAC, Meireles GC, Sarmiento-Leite R, Prudente M, Cantarelli M, et al. Metallic Limus-Eluting Stents Abluminally Coated with Biodegradable Polymers: Angiographic and Clinical Comparison of a Novel Ultra-Thin Sirolimus Stent Versus Biolimus Stent in the DESTINY Randomized Trial. *Cardiovasc Ther*. 2015 Dec;33(6):367–71.
156. Iqbal J, Verheye S, Abizaid A, Ormiston J, de Vries T, Morrison L, et al. DESyne novolimus-eluting coronary stent is superior to Endeavor zotarolimus-eluting coronary stent at five-year follow-up: final results of the multicentre EXCELLA II randomised controlled trial. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol*. 2016 Dec 10;12(11):e1336–42.
157. Kandzari DE, Smits PC, Love MP, Ben-Yehuda O, Banai S, Robinson SD, et al. Randomized Comparison of Ridaforolimus- and Zotarolimus-Eluting Coronary Stents in Patients With Coronary Artery Disease: Primary Results From the BIONICS Trial (BioNIR Ridaforolimus-Eluting Coronary Stent System in Coronary Stenosis). *Circulation*. 2017 Oct 3;136(14):1304–14.
158. Jaguszewski M, Aloysius R, Wang W, Bezerra HG, Hill J, De Winter RJ, et al. The REMEDEE-OCT Study: An Evaluation of the Bioengineered COMBO Dual-Therapy CD34 Antibody-Covered Sirolimus-Eluting Coronary Stent Compared With a Cobalt-Chromium Everolimus-Eluting Stent in Patients With Acute Coronary Syndromes: Insights From Optical Coherence Tomography Imaging Analysis. *JACC Cardiovasc Interv*. 2017 13;10(5):489–99.
159. Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, et al. Paclitaxel-eluting stents show superiority to balloon angioplasty and bare metal stents in femoropopliteal disease: twelve-month Zilver PTX randomized study results. *Circ Cardiovasc Interv*. 2011 Oct 1;4(5):495–504.
160. Dake MD, Ansel GM, Jaff MR, Ohki T, Saxon RR, Smouse HB, et al. Durable Clinical Effectiveness With Paclitaxel-Eluting Stents in the Femoropopliteal Artery: 5-Year Results of the Zilver PTX Randomized Trial. *Circulation*. 2016 Apr 12;133(15):1472–1483; discussion 1483.
161. Gray WA, Keirse K, Soga Y, Benko A, Babaev A, Yokoi Y, et al. A polymer-coated, paclitaxel-eluting stent (Eluvia) versus a polymer-free, paclitaxel-coated stent (Zilver PTX) for endovascular femoropopliteal intervention (IMPERIAL): a randomised, non-inferiority trial. *Lancet Lond Engl*. 2018 27;392(10157):1541–51.
162. Bosiers M, Deloosse K, Callaert J, Verbist J, Hendriks J, Lauwers P, et al. Superiority of stent-grafts for in-stent restenosis in the superficial femoral artery: twelve-month results from a multicenter randomized trial. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec*. 2015 Feb;22(1):1–10.
163. Lammer J, Zeller T, Hausegger KA, Schaefer PJ, Gschwendtner M, Mueller-Huelsbeck S, et al. Heparin-bonded covered stents versus bare-metal stents for complex femoropopliteal artery lesions: the randomized VIASTAR trial (Viabahn endoprosthesis with PROPATEN bioactive surface [VIA] versus bare nitinol stent in the treatment of long lesions in superficial femoral artery occlusive disease). *J Am Coll Cardiol*. 2013 Oct 8;62(15):1320–7.

164. Lammer J, Zeller T, Hausegger KA, Schaefer PJ, Gschwendtner M, Mueller-Huelsbeck S, et al. Sustained benefit at 2 years for covered stents versus bare-metal stents in long SFA lesions: the VIASTAR trial. *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2015 Feb;38(1):25–32.
165. Ohki T, Yokoi H, Kichikawa K, Kimura T, Snyder SA, Ragheb AO, et al. Two-year analysis of the Japanese cohort from the Zilver PTX randomized controlled trial supports the validity of multinational clinical trials. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec*. 2014 Oct;21(5):644–53.
166. Scheinert D, Katsanos K, Zeller T, Koppensteiner R, Commeau P, Bosiers M, et al. A prospective randomized multicenter comparison of balloon angioplasty and infrapopliteal stenting with the sirolimus-eluting stent in patients with ischemic peripheral arterial disease: 1-year results from the ACHILLES trial. *J Am Coll Cardiol*. 2012 Dec 4;60(22):2290–5.
167. Katsanos K, Spiliopoulos S, Diamantopoulos A, Siablis D, Karnabatidis D, Scheinert D. Wound Healing Outcomes and Health-Related Quality-of-Life Changes in the ACHILLES Trial: 1-Year Results From a Prospective Randomized Controlled Trial of Infrapopliteal Balloon Angioplasty Versus Sirolimus-Eluting Stenting in Patients With Ischemic Peripheral Arterial Disease. *JACC Cardiovasc Interv*. 2016 Feb 8;9(3):259–67.
168. Spreen MI, Martens JM, Hansen BE, Knippenberg B, Verhey E, van Dijk LC, et al. Percutaneous Transluminal Angioplasty and Drug-Eluting Stents for Infrapopliteal Lesions in Critical Limb Ischemia (PADI) Trial. *Circ Cardiovasc Interv*. 2016 Feb;9(2):e002376.
169. Spreen MI, Martens JM, Knippenberg B, van Dijk LC, de Vries J-PPM, Vos JA, et al. Long-Term Follow-up of the PADI Trial: Percutaneous Transluminal Angioplasty Versus Drug-Eluting Stents for Infrapopliteal Lesions in Critical Limb Ischemia. *J Am Heart Assoc*. 2017 Apr 14;6(4).
170. Stettler C, Wandel S, Allemann S, Kastrati A, Morice MC, Schömig A, et al. Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis. *Lancet Lond Engl*. 2007 Sep 15;370(9591):937–48.
171. Bangalore S, Toklu B, Amoroso N, Fusaro M, Kumar S, Hannan EL, et al. Bare metal stents, durable polymer drug eluting stents, and biodegradable polymer drug eluting stents for coronary artery disease: mixed treatment comparison meta-analysis. *BMJ*. 2013 Nov 8;347:f6625.
172. Picard F, Pighi M, de Hemptinne Q, Airaksinen J, Vinco G, de Pommereau A, et al. Comparison of the biodegradable polymer everolimus-eluting stent with contemporary drug-eluting stents: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2019 Mar 1;278:51–6.
173. Kang S-H, Park KW, Kang D-Y, Lim W-H, Park KT, Han J-K, et al. Biodegradable-polymer drug-eluting stents vs. bare metal stents vs. durable-polymer drug-eluting stents: a systematic review and Bayesian approach network meta-analysis. *Eur Heart J*. 2014 May;35(17):1147–58.
174. Palmerini T, Biondi-Zoccai G, Della Riva D, Stettler C, Sangiorgi D, D’Ascenzo F, et al. Stent thrombosis with drug-eluting and bare-metal stents: evidence from a comprehensive network meta-analysis. *Lancet Lond Engl*. 2012 Apr 14;379(9824):1393–402.
175. Bavishi C, Baber U, Panwar S, Pirrotta S, Dangas GD, Moreno P, et al. Efficacy and safety of everolimus and zotarolimus-eluting stents versus first-generation drug-eluting stents in patients with diabetes: A meta-analysis of randomized trials. *Int J Cardiol*. 2017 Mar 1;230:310–8.



176. Kang S-H, Chae I-H, Park J-J, Lee HS, Kang D-Y, Hwang S-S, et al. Stent Thrombosis With Drug-Eluting Stents and Bioresorbable Scaffolds: Evidence From a Network Meta-Analysis of 147 Trials. *JACC Cardiovasc Interv.* 2016 27;9(12):1203–12.
177. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, Dotzer F, Schühlen H, Neumann FJ, et al. Intracoronary stenting and angiographic results: strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STERO) trial. *Circulation.* 2001 Jun 12;103(23):2816–21.
178. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, Scheinert D, Zeller T, Tielbeek A, et al. Sirolimus-eluting versus bare nitinol stent for obstructive superficial femoral artery disease: the SIROCCO II trial. *J Vasc Interv Radiol JVIR.* 2005 Mar;16(3):331–8.
179. Duda SH, Bosiers M, Lammer J, Scheinert D, Zeller T, Oliva V, et al. Drug-eluting and bare nitinol stents for the treatment of atherosclerotic lesions in the superficial femoral artery: long-term results from the SIROCCO trial. *J Endovasc Ther Off J Int Soc Endovasc Spec.* 2006 Dec;13(6):701–10.
180. Lammer J, Bosiers M, Zeller T, Schillinger M, Boone E, Zaugg MJ, et al. First clinical trial of nitinol self-expanding everolimus-eluting stent implantation for peripheral arterial occlusive disease. *J Vasc Surg.* 2011 Aug;54(2):394–401.
181. Katsanos K, Spiliopoulos S, Kitrou P, Krokidis M, Karnabatidis D. Risk of Death Following Application of Paclitaxel-Coated Balloons and Stents in the Femoropopliteal Artery of the Leg: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *J Am Heart Assoc.* 2018 Dec 18;7(24):e011245.
182. Park SA, Lee SJ, Lim KS, Bae IH, Lee JH, Kim WD, et al. In vivo evaluation and characterization of a bio-absorbable drug-coated stent fabricated using a 3D-printing system. *Mater Lett.* 2015 Feb 15;141:355–8.
183. Kitabata H, Waksman R, Warnack B. Bioresorbable metal scaffold for cardiovascular application: Current knowledge and future perspectives. *Cardiovasc Revasc Med.* 2014 Mar;15(2):109–16.
184. Ghimire G, Spiro J, Kharbanda R, Roughton M, Barlis P, Mason M, et al. Initial evidence for the return of coronary vasoreactivity following the absorption of bioabsorbable magnesium alloy coronary stents. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2009 Jan;4(4):481–4.
185. Echeverry-Rendon M, Allain JP, Robledo SM, Echeverria F, Harmsen MC. Coatings for biodegradable magnesium-based supports for therapy of vascular disease: A general view. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2019 Sep;102:150–63.
186. Haude M, Erbel R, Erne P, Verheye S, Degen H, Böse D, et al. Safety and performance of the drug-eluting absorbable metal scaffold (DREAMS) in patients with de-novo coronary lesions: 12 month results of the prospective, multicentre, first-in-man BIOSOLVE-I trial. *The Lancet.* 2013;381(9869):836–844.
187. Jabara R, Geva S, Ribeiro HB, Chen JP, Hou D, Li J, et al. A third generation ultra-thin strut cobalt chromium stent: histopathological evaluation in porcine coronary arteries. *EuroIntervention J Eur Collab Work Group Interv Cardiol Eur Soc Cardiol.* 2009 Nov;5(5):619–26.

188. Ajili SH, Ebrahimi NG, Soleimani M. Polyurethane/polycaprolactane blend with shape memory effect as a proposed material for cardiovascular implants. *Acta Biomater.* 2009 Jun;5(5):1519–30.
189. Guerra AJ, San J, Ciurana J. Fabrication of PCL/PLA Composite Tube for Stent Manufacturing. *Procedia CIRP.* 2017 Jan 1;65:231–5.
190. Beilvert A, Chaubet F, Chaunier L, Guilois S, Pavon-Djavid G, Letourneur D, et al. Shape-memory starch for resorbable biomedical devices. *Carbohydr Polym.* 2014 Jan;99:242–8.
191. Beilvert A, Faure F, Meddahi-Pellé A, Chaunier L, Guilois S, Chaubet F, et al. A resorbable shape-memory starch-based stent for the treatment of salivary ducts under sialendoscopic surgery: Resorbable Starch-Stent for Sialendoscopy. *The Laryngoscope.* 2014 Apr;124(4):875–81.
192. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB. Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science.* 2007 Oct 19;318(5849):426–30.
193. Yang Z, Tu Q, Zhu Y, Luo R, Li X, Xie Y, et al. Mussel-Inspired Coating of Polydopamine Directs Endothelial and Smooth Muscle Cell Fate for Re-endothelialization of Vascular Devices. *Adv Healthc Mater.* 2012 Sep;1(5):548–59.
194. Zhong S, Luo R, Wang X, Tang L, Wu J, Wang J, et al. Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014 Apr 1;116:553–60.
195. Tada N, Virmani R, Grant G, Bartlett L, Black A, Clavijo C, et al. Polymer-Free Biolimus A9-Coated Stent Demonstrates More Sustained Intimal Inhibition, Improved Healing, and Reduced Inflammation Compared With a Polymer-Coated Sirolimus-Eluting Cypher Stent in a Porcine Model. *Circ Cardiovasc Interv.* 2010 Apr 1;3(2):174–83.
196. Yu M, Xu B, Kandzari DE, Wu Y, Yan H, Chen J, et al. First report of a novel polymer-free dual-drug eluting stent in *de novo* coronary artery disease: Results of the first in human BICARE trial: First in Human Polymer-Free Drug-Eluting Stent. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2014 Feb 15;83(3):405–11.
197. Prati F, Romagnoli E, Valgimigli M, Burzotta F, De Benedictis M, Ramondo A, et al. Randomized comparison between 3-month Cre8 DES vs. 1-month Vision/Multilink8 BMS neointimal coverage assessed by OCT evaluation: The DEMONSTRATE study. *Int J Cardiol.* 2014 Oct;176(3):904–9.
198. Costa JR, Abizaid A, Costa R, Feres F, Tanajura LF, Abizaid A, et al. 1-Year Results of the Hydroxyapatite Polymer-Free Sirolimus-Eluting Stent for the Treatment of Single De Novo Coronary Lesions. *JACC Cardiovasc Interv.* 2009 May;2(5):422–7.
199. Choi DH, Kang SN, Kim SM, Gobaa S, Park BJ, Kim IH, et al. Growth factors-loaded stents modified with hyaluronic acid and heparin for induction of rapid and tight re-endothelialization. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016 May 1;141:602–10.
200. Miyauchi K, Kasai T, Yokayama T, Aihara K, Kurata T, Kajimoto K, et al. Effectiveness of statin-eluting stent on early inflammatory response and neointimal thickness in a porcine coronary model. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2008 May;72(5):832–8.

201. Tsuchikane E, Suzuki T, Katoh O, Suzuki T. Examination of anti-intima hyperplastic effect on cilostazol-eluting stent in a porcine model. *J Invasive Cardiol.* 2007 Mar;19(3):109–12.
202. Pleiner J. Simvastatin Prevents Vascular Hyporeactivity During Inflammation. *Circulation.* 2004 Nov 23;110(21):3349–54.
203. Walter DH. Statin Therapy Accelerates Reendothelialization: A Novel Effect Involving Mobilization and Incorporation of Bone Marrow-Derived Endothelial Progenitor Cells. *Circulation.* 2002 Jun 25;105(25):3017–24.
204. Frick M, Dulak J, Cisowski J, Józkwicz A, Zwick R, Alber H, et al. Statins differentially regulate vascular endothelial growth factor synthesis in endothelial and vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2003 Oct;170(2):229–36.
205. Zago AC, Matte BS, Reginato L, Iturry-Yamamoto G, Krepsky A, Bergoli LCC, et al. First-in-man study of simvastatin-eluting stent in de novo coronary lesions: the SIMVASTENT study. *Circ J Off J Jpn Circ Soc.* 2012;76(5):1109–14.
206. Tsukie N, Nakano K, Matoba T, Masuda S, Iwata E, Miyagawa M, et al. Pitavastatin-incorporated nanoparticle-eluting stents attenuate in-stent stenosis without delayed endothelial healing effects in a porcine coronary artery model. *J Atheroscler Thromb.* 2013;20(1):32–45.
207. Lee Y-K, Hyung Park J, Tae Moon H, Yun Lee D, Han Yun J, Byun Y. The short-term effects on restenosis and thrombosis of echinomycin-eluting stents topcoated with a hydrophobic heparin-containing polymer☆. *Biomaterials.* 2007 Mar;28(8):1523–30.
208. Kim W, Jeong MH, Kim KH, Sohn IS, Hong YJ, Park HW, et al. The Clinical Results of a Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blocker (Abciximab: ReoPro)-Coated Stent in Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Mar;47(5):933–8.
209. Pourmoghaddas M, Rohani HR, Sanei H, Amirpour A. Undesired Outcomes of the Catania Stent Compared to the Xience Stent in Patients Undergoing Angioplasty: A Double-Blind Randomized Controlled Trial. *Adv Biomed Res [Internet].* 2017 Nov 30;6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5735554/>
210. Hyvelin J-M, Maurel B, Uzbekov R, Motterlini R, Lermusiaux P. Hemin prevents in-stent stenosis in rat and rabbit models by inducing heme-oxygenase-1. *J Vasc Surg.* 2010 Feb;51(2):417–28.
211. Duckers HJ, Boehm M, True AL, Yet SF, San H, Park JL, et al. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation. *Nat Med.* 2001 Jun;7(6):693–8.
212. Deshane J, Chen S, Caballero S, Grochot-Przeczek A, Was H, Li Calzi S, et al. Stromal cell-derived factor 1 promotes angiogenesis via a heme oxygenase 1-dependent mechanism. *J Exp Med.* 2007 Mar 19;204(3):605–18.
213. Otterbein LE, Bach FH, Alam J, Soares M, Tao Lu H, Wysk M, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat Med.* 2000 Apr;6(4):422–8.
214. Ollinger R, Bilban M, Erat A, Froio A, McDaid J, Tyagi S, et al. Bilirubin: a natural inhibitor of vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2005 Aug 16;112(7):1030–9.

215. Ylä-Herttuala S, Baker AH. Cardiovascular Gene Therapy: Past, Present, and Future. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2017 03;25(5):1095–106.
216. Lekshmi KM, Che H-L, Cho C-S, Park I-K. Drug- and Gene-eluting Stents for Preventing Coronary Restenosis. *Chonnam Med J*. 2017 Jan;53(1):14–27.
217. Kim TG, Lee Y, Park TG. Controlled gene-eluting metal stent fabricated by bio-inspired surface modification with hyaluronic acid and deposition of DNA/PEI polyplexes. *Int J Pharm*. 2010 Jan 15;384(1–2):181–8.
218. Yang J, Zeng Y, Zhang C, Chen Y-X, Yang Z, Li Y, et al. The prevention of restenosis in vivo with a VEGF gene and paclitaxel co-eluting stent. *Biomaterials*. 2013 Feb 1;34(6):1635–43.
219. Sharif F, Hynes SO, Cooney R, Howard L, McMahon J, Daly K, et al. Gene-eluting Stents: Adenovirus-mediated Delivery of eNOS to the Blood Vessel Wall Accelerates Re-endothelialization and Inhibits Restenosis. *Mol Ther*. 2008 Oct 1;16(10):1674–80.
220. Schaer GL, Zhang C. Implementation of miRNAs to Reduce In-Stent Restenosis in the Future. *J Am Coll Cardiol*. 2015 Jun 2;65(21):2328–30.
221. Muthiah M, Islam MA, Cho CS, Hwang JE, Chung I-J, Park IK. Substrate-mediated delivery of microRNA-145 through a polysorbitol-based osmotically active transporter suppresses smooth muscle cell proliferation: implications for restenosis treatment. *J Biomed Nanotechnol*. 2014 Apr;10(4):571–9.
222. Hwang C-W, Johnston PV, Gerstenblith G, Weiss RG, Tomaselli GF, Bogdan VE, et al. Stem cell impregnated nanofiber stent sleeve for on-stent production and intravascular delivery of paracrine factors. *Biomaterials*. 2015 Jun;52:318–26.
223. Sobocinski J, Laure W, Taha M, Courcot E, Chai F, Simon N, et al. Mussel inspired coating of a biocompatible cyclodextrin based polymer onto CoCr vascular stents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Mar 12;6(5):3575–86.
224. Pérez-Anes A, Gargouri M, Laure W, Van Den Berghe H, Courcot E, Sobocinski J, et al. Bioinspired Titanium Drug Eluting Platforms Based on a Poly- $\beta$ -cyclodextrin-Chitosan Layer-by-Layer Self-Assembly Targeting Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015 Jun 17;7(23):12882–93.
225. Yang Z, Tu Q, Zhu Y, Luo R, Li X, Xie Y, et al. Mussel-inspired coating of polydopamine directs endothelial and smooth muscle cell fate for re-endothelialization of vascular devices. *Adv Healthc Mater*. 2012 Sep;1(5):548–59.
226. Xiaoli Liu ZZ, Xiaoli Liu ZZ. Multifunctional MgF<sub>2</sub>/Polydopamine Coating on Mg Alloy for Vascular Stent Application. *J Mater Sci Technol*. 2015 Jul 23;31(7):733–43.
227. Weng Y, Song Q, Zhou Y, Zhang L, Wang J, Chen J, et al. Immobilization of selenocystamine on TiO<sub>2</sub> surfaces for in situ catalytic generation of nitric oxide and potential application in intravascular stents. *Biomaterials*. 2011 Feb 1;32(5):1253–63.
228. Yang Z, Yang Y, Zhang L, Xiong K, Li X, Zhang F, et al. Mussel-inspired catalytic selenocystamine-dopamine coatings for long-term generation of therapeutic gas on cardiovascular stents. *Biomaterials*. 2018 Sep;178:1–10.

229. Che H-L, Bae I-H, Lim KS, Song IT, Lee H, Muthiah M, et al. Suppression of post-angioplasty restenosis with an Akt1 siRNA-embedded coronary stent in a rabbit model. *Biomaterials*. 2012 Nov;33(33):8548–56.
230. Fan Y, Zhang Y, Zhao Q, Xie Y, Luo R, Yang P, et al. Immobilization of nano Cu-MOFs with polydopamine coating for adaptable gasotransmitter generation and copper ion delivery on cardiovascular stents. *Biomaterials*. 2019 Jun;204:36–45.
231. Wang J, Li B, Li Z, Ren K, Jin L, Zhang S, et al. Electropolymerization of dopamine for surface modification of complex-shaped cardiovascular stents. *Biomaterials*. 2014 Sep 1;35(27):7679–89.
232. Xu C, Xu K, Gu H, Zheng R, Liu H, Zhang X, et al. Dopamine as A Robust Anchor to Immobilize Functional Molecules on the Iron Oxide Shell of Magnetic Nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2004 Aug;126(32):9938–9.
233. Vetrone F, Variola F, Tambasco de Oliveira P, Zalzal SF, Yi J-H, Sam J, et al. Nanoscale Oxidative Patterning of Metallic Surfaces to Modulate Cell Activity and Fate. *Nano Lett*. 2009 Feb 11;9(2):659–65.
234. Shi Z, Neoh KG, Kang ET. In vitro endothelialization of cobalt chromium alloys with micro/nanostructures using adipose-derived stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Apr;24(4):1067–77.
235. Sobocinski J, Laure W, Taha M, Courcot E, Chai F, Simon N, et al. Mussel Inspired Coating of a Biocompatible Cyclodextrin Based Polymer onto CoCr Vascular Stents. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2014 Feb 26;140226104601009.
236. National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Internet]*. 8th ed. Washington (DC): National Academies Press (US); 2011. (The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050/>
237. Hong S, Na YS, Choi S, Song IT, Kim WY, Lee H. Non-Covalent Self-Assembly and Covalent Polymerization Co-Contribute to Polydopamine Formation. *Adv Funct Mater*. 2012;22(22):4711–7.
238. Ku SH, Park CB. Human endothelial cell growth on mussel-inspired nanofiber scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 2010 Dec;31(36):9431–7.
239. Luo R, Tang L, Zhong S, Yang Z, Wang J, Weng Y, et al. In vitro investigation of enhanced hemocompatibility and endothelial cell proliferation associated with quinone-rich polydopamine coating. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Mar 13;5(5):1704–14.
240. Ding Y, Yang Z, Bi CWC, Yang M, Zhang J, Xu SL, et al. Modulation of protein adsorption, vascular cell selectivity and platelet adhesion by mussel-inspired surface functionalization. *J Mater Chem B*. 2014;2(24):3819–29.
241. Luo R, Tang L, Wang J, Zhao Y, Tu Q, Weng Y, et al. Improved immobilization of biomolecules to quinone-rich polydopamine for efficient surface functionalization. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2013 Jun 1;106:66–73.

242. Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat Med*. 2002 Nov;8(11):1249–56.
243. Miura S-I, Matsuo Y, Kawamura A, Saku K. JTT-705 blocks cell proliferation and angiogenesis through p38 kinase/p27(kip1) and Ras/p21(waf1) pathways. *Atherosclerosis*. 2005 Oct;182(2):267–75.
244. Chien C-Y, Tsai W-B. Poly(dopamine)-assisted immobilization of Arg-Gly-Asp peptides, hydroxyapatite, and bone morphogenic protein-2 on titanium to improve the osteogenesis of bone marrow stem cells. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2013 Aug 14;5(15):6975–83.
245. Joddar B, Albayrak A, Kang J, Nishihara M, Abe H, Ito Y. Sustained delivery of siRNA from dopamine-coated stainless steel surfaces. *Acta Biomater*. 2013 May;9(5):6753–61.
246. Li B, Chang H, Ren K, Ji J. Substrate-mediated delivery of gene complex nanoparticles via polydopamine coating for enhancing competitiveness of endothelial cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Nov 1;147:172–9.
247. Qiu W-Z, Yang H-C, Xu Z-K. Dopamine-assisted co-deposition: An emerging and promising strategy for surface modification. *Adv Colloid Interface Sci*. 2018 Jun 1;256:111–25.
248. Hamerli P. Surface properties of and cell adhesion onto allylamine-plasma-coated polyethyleneterephthalat membranes. *Biomaterials*. 2003 Oct;24(22):3989–99.
249. Pérez-Anes A, Gargouri M, Laure W, et al. Bioinspired Titanium Drug Eluting Platforms Based on a Poly- $\beta$ -cyclodextrin–Chitosan Layer-by-Layer Self-Assembly Targeting Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015.
250. Mayer G, Blanchemain N, Dupas-Bruzek C, Miri V, Traisnel M, Gengembre L, et al. Physico-chemical and biological evaluation of excimer laser irradiated polyethylene terephthalate (pet) surfaces. *Biomaterials*. 2006 Feb;27(4):553–66.
251. Castellanos MI, Mas-Moruno C, Grau A, Serra-Picamal X, Trepas X, Albericio F, et al. Functionalization of CoCr surfaces with cell adhesive peptides to promote HUVECs adhesion and proliferation. *Appl Surf Sci*. 2017 Jan;393:82–92.
252. Liu Y, Luo R, Shen F, Tang L, Wang J, Huang N. Construction of mussel-inspired coating via the direct reaction of catechol and polyethyleneimine for efficient heparin immobilization. *Appl Surf Sci*. 2015 Feb;328:163–9.
253. Cao Y, Liu N, Zhang W, Feng L, Wei Y. One-Step Coating toward Multifunctional Applications: Oil/Water Mixtures and Emulsions Separation and Contaminants Adsorption. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Feb 10;8(5):3333–9.
254. Pan C, Chen L, Liu S, Zhang Y, Zhang C, Zhu H, et al. Dopamine-assisted immobilization of partially hydrolyzed poly(2-methyl-2-oxazoline) for antifouling and biocompatible coating. *J Mater Sci*. 2016 Mar 1;51(5):2427–42.
255. Tsai W-B, Chien C-Y, Thissen H, Lai J-Y. Dopamine-assisted immobilization of poly(ethylene imine) based polymers for control of cell–surface interactions. *Acta Biomater*. 2011 Jun 1;7(6):2518–25.

256. Yang Y, Qi P, Ding Y, F. Maitz M, Yang Z, Tu Q, et al. A biocompatible and functional adhesive amine-rich coating based on dopamine polymerization. *J Mater Chem B*. 2015;3(1):72–81.
257. Liu Y, Luo R, Shen F, Tang L, Wang J, Huang N. Construction of mussel-inspired coating via the direct reaction of catechol and polyethyleneimine for efficient heparin immobilization. *Appl Surf Sci*. 2015 Feb;328:163–9.
258. Biomaterials Science - 2nd Edition [Internet]. [cited 2019 Aug 24]. Available from: <https://www.elsevier.com/books/biomaterials-science/ratner/978-0-08-047036-8>
259. Li X, Deng J, Yuan S, Wang J, Luo R, Chen S, et al. Fabrication of endothelial progenitor cell capture surface via DNA aptamer modifying dopamine/polyethyleneimine copolymer film. *Appl Surf Sci*. 2016 Nov;386:138–50.
260. Morita T, Mitsialis SA, Koike H, Liu Y, Kourembanas S. Carbon Monoxide Controls the Proliferation of Hypoxic Vascular Smooth Muscle Cells. *J Biol Chem*. 1997 Dec 26;272(52):32804–9.
261. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res*. 1999 Oct 15;85(8):663–71.
262. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 2019 Aug 24]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1517245>
263. Li T, Tian H, Zhao Y, An F, Zhang L, Zhang J, et al. Heme oxygenase-1 inhibits progression and destabilization of vulnerable plaques in a rabbit model of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2011 Dec 15;672(1):143–52.
264. Hayashi T, Hisaeda Y. New Functionalization of Myoglobin by Chemical Modification of Heme-Propionates. *Acc Chem Res*. 2002 Jan;35(1):35–43.
265. Bauer J, Fornnarino J. High-performance liquid chromatographic analysis of “available” hemin in hematin solutions. *J Chromatogr*. 1984 Jan 20;283:378–82.
266. Phinikaridou A, Hallock KJ, Qiao Y, Hamilton JA. A robust rabbit model of human atherosclerosis and atherothrombosis. *J Lipid Res*. 2009 May;50(5):787.
267. Lombardo ME, Araujo LS, Ciccarelli AB, Batlle A. A spectrophotometric method for estimating hemin in biological systems. *Anal Biochem*. 2005 Jun;341(2):199–203.
268. Roos TU, Heiss EH, Schwaiberger AV, Schachner D, Sroka IM, Oberan T, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits PDGF-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via activation of p38 MAPK, HIF-1 $\alpha$ , and heme oxygenase-1. *J Nat Prod*. 2011 Mar 25;74(3):352–6.
269. Shang S, Wang H. Flame atomic absorption spectrometric determination of copper, zinc, calcium, magnesium and iron in fresh eggs using microvolume injection. *Talanta*. 1997 Feb;44(2):269–74.

## RESUME

Introduction : La resténose intra-stent (RIS) est induite par une prolifération incontrôlée des cellules musculaires lisses (CML) après l'implantation d'une stent métallique nu (BMS). Elle est associée à la récurrence des symptômes et à des coûts de santé supplémentaires. Les stents à élution médicamenteuse, dits « actifs », ont démontré leur efficacité sur la RIS, mais induisent un risque élevé de thrombose aiguë tardive due à une réendothélialisation tardive des mailles. La polydopamine (PDA), un polymère biocompatible inspiré du mucus sécrété par les moules, promouvrait la prolifération de cellules endothéliales (CE) et inhiberait la prolifération des CMV in-vitro, ce qui suggère un effet pro-cicatrisant potentiel sur la paroi vasculaire. De plus, la polydopamine exprime des fonctions amines, catéchols et quinones à sa surface et peut être utilisée comme ancrage pour un autre agent thérapeutique. Le but de ce travail était 1) d'évaluer l'impact d'un stent enduit de PDA sur la RIS, 2) de concevoir un stent vasculaire à base de PDA délivrant une autre substance pro-cicatrisante, l'hémine.

Méthodes : Dans la première partie de cette étude, les revêtements PDA étaient obtenus par immersion de disques de cobalt-chrome ou de stents dans une solution de dopamine. La biocompatibilité et l'hémocompatibilité étaient vérifiées in vitro. Le potentiel pro-cicatrisant était étudié in vitro par culture d'EC et de CML d'origine humaine sur les différents échantillons. L'effet pro-cicatrisant était étudié in-vivo après implantation de stents en position aortique chez le rat. La RIS était évaluée en microscopie optique par quantification du rapport néointima/media (n/m) après coloration éosine/hématoxyline. La qualité de la réendothélialisation des mailles était évaluée par microscopie électronique à transmission (MET). Les voies moléculaires potentiellement impliquées dans un effet pro-cicatrisant étaient étudiées par analyses Western Blot.



Dans la deuxième partie de ce travail, les surfaces revêtues de PDA étaient modifiées avec de la polyéthylèneimine (PEI) pour améliorer l'expression des fonctions amines. Ce revêtement modifié était caractérisé et sa cytocompatibilité évaluée in vitro. Cette surface modifiée était ensuite utilisée pour immobiliser l'hémine. Les surfaces fonctionnalisées étaient caractérisées et la quantité d'hémine greffée déterminée. L'effet pro-cicatrisant potentiel du stent à l'hémine était évalué in vitro et in vivo.

Résultats : Les surfaces de PDA démontraient un effet pro-cicatrisant in-vitro par rapport au chrome-cobalt nu. Les stents PDA montraient une réduction significative de la RIS par rapport aux stents nu (rapport n/m = 0,48 (+/- 0,26) contre 0,83 (+/- 0,42),  $p < 0,001$ ) dans le modèle de rat. Les analyses en TEM confirmaient la réendothélialisation des mailles dans chaque groupe et révélait une couche de néointima plus mince dans le groupe PDA que dans le groupe BMS. Les analyses Western blot permettaient d'identifier une tendance à une activation accrue de la phosphorylation de la MAPK p38 et de ses effets antiprolifératifs sur les CML, ce qui pourrait expliquer les résultats observés lors des analyses histomorphométriques.

L'immobilisation de la PEI sur les revêtements PDA permettait d'enrichir avec succès les surfaces en fonctions amines sans diminuer leur cytocompatibilité. L'hémine était ensuite greffée par création de lien amides (environ 10 ng d'hémine par  $\text{cm}^2$ ). Les surfaces enduites d'hémine ne montraient pas de supériorité in-vitro ou in-vivo par rapport au PDA seul.

Conclusion : L'effet pro-cicatrisant attendu du revêtement PDA sur la paroi artérielle semble confirmé dans ce modèle in-vivo. Ce polymère biocompatible pourrait limiter intrinsèquement la RIS. De plus, il offre la possibilité d'immobiliser d'autres médicaments pertinents sur sa surface afin d'obtenir un effet synergique potentiel.

**Introduction:** In-stent restenosis (ISR) is induced by an uncontrolled smooth muscular cells (SMC) proliferation after bare metal stent (BMS) implantation. It is associated with recurrence of symptoms and additional health costs. Drug-eluting stents have demonstrated efficiency on ISR but induce a high risk of late acute thrombosis due to a delayed struts reendothelialization. Polydopamine (PDA), a biocompatible polymer inspired from mussels byssus, has been reported to promote endothelial cells (EC) and inhibit SMC proliferation *in-vitro*, thus suggesting a potential pro-healing effect on the vascular wall. Furthermore, polydopamine expresses amine and carboxylic functions on its surface and can be used as a carrier for another therapeutic agent. This study aimed at 1) evaluating the impact of a PDA-coated stent on in-stent restenosis (ISR) *in-vivo*, 2) designing a vascular stent with a potential additional pro-healing drug, hemin, carried via the PDA.

**Methods:** In the first part of this study, PDA coatings were obtained by dip coating of cobalt-chromium disks or stents in a dopamine solution. Disk samples were used to evaluate biocompatibility and hemocompatibility. The pro-healing potential was investigated *in-vitro* by seeding human EC and SMC on the different samples. *In-vivo* experimentations were conducted to assess the pro-healing effect in a rat model. ISR was evaluated in optic microscopy with quantification of the neointima/media (n/m) ratio after eosin/hematoxylin coloration. Quality of the struts reendothelialization was assessed with transmission electron microscopy (TEM). Molecular pathways involved in a potential pro-healing effect were investigated with western blot analyses.

In the second part of this work, PDA-coated surfaces were modified with polyethylenimine (PEI) to enhance the expression of amine functions. This modified coating was characterized and cytocompatibility was assessed *in-vitro*. In the third part, this modified surface was used

to immobilized hemin, a novel therapeutic agent, on the sample surfaces. Functionalized surfaces were characterized, and presence of the therapeutic agents was assessed and quantified. The potential healing effect of the hemin-stent was evaluated *in-vitro* ad *in-vivo*.

**Results:** PDA surfaces demonstrated a pro-healing effect *in-vitro* compared to bare chromium-cobalt. PDA stents demonstrated a significant reduction in ISR compared to bare metal stents (ratio n/m = 0.48 (+/- 0.26) versus 0.83 (+/- 0.42),  $p < 0.001$ ) in the rat model. TEM analyses confirmed the presence of neointima surrounding the struts in each group and revealed a thinner neointima layer in the PDA-stent group compared to BMS, with similar ultrastructures of the cells facing the arterial lumen. Western blot analyses identified a trend to an increased activation of p38 MAPK phosphorylation and its anti-proliferative effects on vascular SMC which could explain the results observed in the histomorphometric analyses.

Immobilization of PEI was achieved through Michael addition and Shift base reaction on PDA coatings, and successfully enriched the surfaces with amino groups without decreasing cytocompatibility. Hemin was successfully grafted on the PDA-PEI surfaces via amide bounds (approximately 10ng of hemin per  $\text{cm}^2$ ). Hemin-coated surfaces demonstrated no superiority *in-vitro* or *in-vivo* to PDA alone.

**Conclusion:** The pro-healing effect expected of PDA-coating on the arterial wall seems to be confirmed in this *in-vivo* model. This biocompatible polymer could intrinsically limit in-stent restenosis. Additionally, it also offers the possibility to immobilize many relevant drugs on its surface through amine functions providing potential synergistic effects.

## RESUME

**Introduction** : La resténose intra-stent (RIS) est induite par une prolifération incontrôlée des cellules musculaires lisses (CML) après l'implantation d'une stent métallique nu (BMS). Elle est associée à la récurrence des symptômes et à des coûts de santé supplémentaires. Les stents à élution médicamenteuse, dits « actifs », ont démontré leur efficacité sur la RIS, mais induisent un risque élevé de thrombose aiguë tardive due à une réendothélialisation tardive des mailles. La polydopamine (PDA), un polymère biocompatible inspiré du mucus sécrété par les moules, promouvrait la prolifération de cellules endothéliales (CE) et inhiberait la prolifération des CMV in-vitro, ce qui suggère un effet pro-cicatrisant potentiel sur la paroi vasculaire. De plus, la polydopamine exprime des fonctions amines, catéchols et quinones à sa surface et peut être utilisée comme ancrage pour un autre agent thérapeutique. Le but de ce travail était 1) d'évaluer l'impact d'un stent enduit de PDA sur la RIS, 2) de concevoir un stent vasculaire à base de PDA délivrant une autre substance pro-cicatrisante, l'hémimine.

**Méthodes** : Dans la première partie de cette étude, les revêtements PDA étaient obtenus par immersion de disques de cobalt-chrome ou de stents dans une solution de dopamine. La biocompatibilité et l'hémocompatibilité étaient vérifiées in vitro. Le potentiel pro-cicatrisant était étudié in vitro par culture d'EC et de CML d'origine humaine sur les différents échantillons. L'effet pro-cicatrisant était étudié in-vivo après implantation de stents en position aortique chez le rat. La RIS était évaluée en microscopie optique par quantification du rapport néointima/media (n/m) après coloration éosine/hématoxilline. La qualité de la réendothélialisation des mailles était évaluée par microscopie électronique à transmission (MET). Les voies moléculaires potentiellement impliquées dans un effet pro-cicatrisant étaient étudiées par analyses Western Blot.

Dans la deuxième partie de ce travail, les surfaces revêtues de PDA étaient modifiées avec de la polyéthylèneimine (PEI) pour améliorer l'expression des fonctions amines. Ce revêtement modifié était caractérisé et sa cytocompatibilité évaluée in vitro. Cette surface modifiée était ensuite utilisée pour immobiliser l'hémimine. Les surfaces fonctionnalisées étaient caractérisées et la quantité d'hémimine greffée déterminée. L'effet pro-cicatrisant potentiel du stent à l'hémimine était évalué in vitro et in vivo.

**Résultats** : Les surfaces de PDA démontraient un effet pro-cicatrisant in-vitro par rapport au chrome-cobalt nu. Les stents PDA montraient une réduction significative de la RIS par rapport aux stents nu (rapport n/m = 0,48 (+/- 0,26) contre 0,83 (+/- 0,42),  $p < 0,001$ ) dans le modèle de rat. Les analyses en TEM confirmaient la réendothélialisation des mailles dans chaque groupe et révélaient une couche de néointima plus mince dans le groupe PDA que dans le groupe BMS. Les analyses Western blot permettaient d'identifier une tendance à une activation accrue de la phosphorylation de la MAPK p38 et de ses effets antiprolifératifs sur les CML, ce qui pourrait expliquer les résultats observés lors des analyses histomorphométriques.

L'immobilisation de la PEI sur les revêtements PDA permettait d'enrichir avec succès les surfaces en fonctions amines sans diminuer leur cytocompatibilité. L'hémimine était ensuite greffée par création de lien amides (environ 10 ng d'hémimine par  $\text{cm}^2$ ). Les surfaces enduites d'hémimine ne montraient pas de supériorité in-vitro ou in-vivo par rapport au PDA seul.

**Conclusion** : L'effet pro-cicatrisant attendu du revêtement PDA sur la paroi artérielle semble confirmé dans ce modèle in-vivo. Ce polymère biocompatible pourrait limiter intrinsèquement la RIS. De plus, il offre la possibilité d'immobiliser d'autres médicaments pertinents sur sa surface afin d'obtenir un effet synergique potentiel.