



**HAL**  
open science

# Développement de films minces de polyuréthanes sur du Cobalt Chrome : amélioration de l'hémocompatibilité d'un métal de référence utilisé dans la fabrication d'endoprothèses vasculaires

Audrey Gossart

## ► To cite this version:

Audrey Gossart. Développement de films minces de polyuréthanes sur du Cobalt Chrome : amélioration de l'hémocompatibilité d'un métal de référence utilisé dans la fabrication d'endoprothèses vasculaires. Santé. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCD034 . tel-03106471

**HAL Id: tel-03106471**

**<https://theses.hal.science/tel-03106471v1>**

Submitted on 11 Jan 2021

**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.

# Thèse de doctorat de l'Université Sorbonne Paris Cité

Préparée à l'Université Paris 13 UFR SMBH

Ecole Doctorale 563-MTCI

Laboratory of Vascular Translational Science (LVTS) Inserm U1148

## Développement de films minces de polyuréthanes sur du Cobalt Chrome : Amélioration de l'hémocompatibilité d'un métal de référence utilisé dans la fabrication d'endoprothèses vasculaires

Par Audrey GOSSART

Thèse dirigée par le Dr Didier Letourneur

Co-dirigée par le Pr Emmanuel Pauthe

Présentée et soutenue publiquement le 19 avril 2019 à Neuville sur Oise devant un jury composé de :

<b>Président du jury</b>	Pr Emmanuel Martinod	APHP, Hôpital Avicenne, USPC
<b>Rapporteur</b>	Pr Gaétan Laroche	LIS, Université Laval, Canada
<b>Rapporteur</b>	Dr Patrick Lacolley	DCAC, Inserm U1116, Nancy
<b>Directeur de thèse</b>	Dr Didier Letourneur	LVTS, Inserm U 1148, Paris
<b>Co-directeur de thèse</b>	Pr Emmanuel Pauthe	ERRMECe, Université de Cergy Pontoise
<b>Co-encadrante</b>	Dr Véronique Ollivier	LVTS, Inserm U 1148, Paris
<b>Invité</b>	Pr J Paul Santerre	IBBME, University of Toronto, Canada
<b>Invitée</b>	Dr Adeline Gand	ERRMECe, Université de Cergy Pontoise

# Avant-propos

---

*Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le laboratoire LVTS (Laboratory for Vascular Translational Science), Inserm U1148 Hôpital Bichat, Paris, le laboratoire ERRMECe (Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellule), Université de Cergy Pontoise et le laboratoire IBBME (Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering), University of Toronto, Canada.*

# Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse **Didier Letourneur** pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse, d'avoir fait confiance à Emmanuel et Paul pour mon recrutement. Merci pour vos précieux conseils et vos superbes idées durant nos réunions. Vos remarques ont toujours été pertinentes et m'ont permis d'avancer durant ces 3 ans. C'était un plaisir d'apprendre à vos côtés.

Je voudrais également remercier mon co-directeur de thèse **Emmanuel Pauthe**. Lorsque nous nous sommes rencontrés, je n'étais encore qu'une étudiante sans expérience en laboratoire et tout de suite tu m'as fait confiance. Finalement, nous ne nous sommes jamais quittés jusqu'à la fin de cette thèse. Notre relation n'a pas toujours été facile mais je ne retiens que le meilleur ... Je voulais te dire sincèrement merci du fond du cœur pour toutes ces années passées à tes côtés, tous ces fous rires, ces congrès passés ensemble qui resteront à jamais gravés dans mon cœur.

Je remercie également du fond du cœur **Paul Santerre**. Nous nous sommes rencontrés lors de mon stage de master au Canada et vous m'avez accueillie chez vous comme un membre de votre famille, vous avez été ma famille durant mes 6 mois à Toronto et pour cela je ne vous remercierai jamais assez. Vous avez été mon mentor durant ces 3 années de thèse, vous avez toujours été là pour moi, même à 6 000 km de moi. Vous êtes une personne exceptionnelle et je suis heureuse d'avoir eu la chance de croiser votre chemin et de travailler à vos côtés, vous m'avez appris tellement de choses ... Je n'oublierai jamais toutes ces longues heures passées sur votre balcon à discuter de tout et de rien, vos précieux conseils ... vous vous êtes toujours soucié de moi, de mon bien être et de mes envies. Vous avez été parfait !!! Je tiens également à remercier votre femme **Shelley** avec qui j'ai passé de supers moments ainsi que vos enfants **Thomas** et **Kelsey** et votre nièce **Megan**. Vous êtes une superbe famille.

Je tiens également à remercier **Véronique Ollivier** alias « maman Véro » car c'est vrai tu as été un peu comme ma maman durant ces 3 ans. Tu as toujours été là pour moi tout en me laissant faire ce que je voulais. Clairement tu as été juste parfaite, je n'aurai pas pu rêver meilleure encadrante que toi. Tu as été une source de savoir et de connaissances énormes durant ces 3 ans, « la reine de la coag » c'est toi. J'ai tellement appris à tes côtés. Merci pour ces nombreuses heures de corrections, pour tes conseils, ta présence quand ça n'allait pas, pour



m'avoir de nombreuses fois rassurées. Comme je l'ai toujours dit j'ai eu beaucoup de chance d'avoir croisé ton chemin. Je suis ta première et ta dernière thésarde et c'est bien dommage car tu aurais fait beaucoup d'heureux ... Je n'oublierai jamais tout ce que tu as fait pour moi, tu as été juste parfaite, mille merci ma petite Véro.

Je souhaiterais également remercier **Adeline Gand**. Nous nous sommes rencontrées il y a maintenant 5 ans et nous ne nous sommes jamais quittées. Tu as été beaucoup présente durant toutes ces années. Tu as toujours été là pour me rassurer, m'écouter ... tu es l'une des rares personnes qui réussissaient à m'apaiser quand j'étais énervée, stressée, paniquée ... je n'oublierai jamais tous nos moments passés ensemble, au labo, en congrès ou dans ta vie parisienne. D'ailleurs je tiens à remercier **Aurélien** pour sa patience toutes les fois où on était chez toi à travailler pour les articles, les week-ends et les vacances. Merci pour ton accueil et merci pour m'avoir fait autant rire. Une petite pensée également pour ma « **Baby Princesse Armance** » que j'adore !!!

Je tiens à remercier les membres du jury. **Dr Gaétan Laroche** et **Dr Patrick Lacolley** pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse ainsi que le **Pr Emmanuel Martinod** pour avoir accepté d'être examinateur.

Je tiens à remercier les directeurs de mes 2 laboratoires **Didier Letourneur** (LVTS, Inserm U1148) et **Olivier Gallet** (ERRMECe, Maison International de la Recherche) pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions. **Olivier** merci pour toutes ces soirées passées à la MIR en ta compagnie et tous ces fous rires.

Je souhaiterais remercier du fond du cœur **Véronique Regnault** qui nous a accueillies, avec Véro, à bras ouvert dans son laboratoire et nous a permis de faire une manip essentielle pour cette thèse. Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre transmission du savoir avec un regret que vous ne soyez pas dans mon jury de thèse. Je tiens également à remercier **Patrick Lacolley** pour son accueil au sein de son laboratoire et de nous avoir permis d'obtenir ces résultats si précieux.

Je souhaiterais également remercier la plateforme de spectrométrie de Rouen et plus particulièrement **Amine et Pascal Cosette** pour leur temps passé sur mes échantillons, leur aide et leur travail.

Je tiens à remercier les laboratoires LPPI avec **Sébastien Péralta** et **Cédric Vancaeyzele** et L2MGC avec **Annelise Cousture** pour leur accueil et leur aide si précieuse durant la première année de cette thèse sur la partie caractérisation de surface.

Je souhaiterais remercier le **Pr Pierre Henri Gouyon**. Vous avez été mon premier maître de stage en L2. Je pense que ni vous ni moi nous douterions que finalement j'irai jusqu'en thèse. En tout cas je garde un super souvenir de mon mois de stage au sein du MNHN à vos côtés et je vous remercie pour tout.

Je remercie **Pr Véronique Larreta-Garde**, vous m'avez donné le goût de la recherche pendant mon tout premier stage et c'est en partie grâce à vous si j'ai eu envie de poursuivre mes études en thèse. Vous êtes un puits de savoir et de connaissances et vous m'avez beaucoup appris.

Je remercie également **Asma** pour tous ces moments passés ensemble, et surtout pour m'avoir toujours permis de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Je voudrais également remercier **Catherine Deschildre** pour sa bonne humeur au quotidien ainsi que **Marie Nathalie**.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Jean Baptiste Michel, Lucas, Yacine** et **Stéphane** pour leur aide précieuse durant cette thèse. Merci pour vos disponibilités durant ces 3 ans.

Je remercie chaleureusement **Frederic Chaubet** qui a toujours été présent pour résoudre mes divers problèmes avec l'université. Merci pour votre aide, votre réactivité et vos conseils.

Je remercie l'équipe du 3<sup>ème</sup> pour leur joie et leur bonne humeur quotidienne, plus particulièrement **Cédric** alias « Chemise Hawaïenne », **Soraya, Marie Noel, Térésa** et **Rachida**.

Je remercie tous mes collègues du laboratoire LVTS avec lesquels j'ai partagé beaucoup de choses, des rires, des pleurs, des soirées ... Je remercie particulièrement **Marie Anne, Kristell, Lucas, Angel, Karen, Leila, Kevin (« Buzz ») Varouna, Adrian, Keltouma** et **Devy**.

Une spéciale dédicace à **Soumaya, Kamel** et **Pauline**. Vous avez été d'un soutien si précieux durant ces 3 ans, merci pour tous ces moments passés ensemble même si aussi vite arrivé que déjà reparti.

Je tiens à remercier les membres du laboratoire ERRMECe et plus particulièrement le staff technique **Remy, Mathilde** et **Lamia** et la Team Biosan avec **Violeta, Adeline, Emmanuel, Michel** et **Véronique**. Un grand merci à **Michel** pour ces précieux conseils et son aide pour la partie chimie ainsi qu'à **Damien** pour sa bonne humeur quotidienne. Je remercie également **Sabrina** pour ta bonne humeur, des petits conseils par-ci par-là toujours pertinents. Les filles ont beaucoup de chance de t'avoir comme co-encadrante.

Je voudrais également remercier le bureau des DOCs avec **Rony, Andrey, Soria**. Une grosse pensée également pour les anciens : **Lyvia, Eleonore, Ruru, Houda, Andrea, Julie, Rayane, Amine** et **Charlotte**. Merci pour tous ces moments passés ensemble.

Je tiens à remercier tout particulièrement **Mathieu** et **Thomas**. On a fait une bonne partie de cette thèse ensemble, j'ai des souvenirs pleins la tête avec tous ces fous rires, ces soirées passées au labo ou en dehors. Merci pour tous les gars, je n'oublierai jamais tout cela.

Je tiens à remercier, avec une grande émotion, mes collègues **Amel, Carine (alias « Caro »)** et **Mathilde**. Il y a tellement de choses à dire mais vous savez déjà tout ... c'est avec une grande émotion que je quitte ce bureau où j'ai passé des moments exceptionnels à vos côtés. J'aurais aimé que ça dure plus longtemps, malheureusement toutes les bonnes choses ont une fin ... Il s'est passé beaucoup de choses dans ce bureau, des moments de joie comme de grand moment de tristesse, on a vécu cela ensemble et on continuera ... N'oubliez jamais « qu'il est fait pour ça ce bureau ... ». Je n'oublie pas **Hassan**, merci pour ta bonne humeur au bureau et surtout d'avoir réussi à supporter 4 gonzesses. Enfin, merci pour ton aide lors de la rédaction de ce manuscrit.

Ma **Lamia**, tu as été un soutien incontestable depuis le début de cette thèse, c'est avec beaucoup de tristesse que nos chemins se séparent mais tous ces moments passés ensemble resteront à jamais gravés. Je tiens également à te remercier pour ces longues heures passées ensemble à respirer de l'éthanol à en avoir mal à la tête pour nettoyer ces surfaces de CoCr. C'était horrible mais tu l'as fait avec moi et ça je ne l'oublierai jamais ...

Je tiens à remercier mes amis qui m'ont supportée pendant ces 3 années. Ça n'a pas toujours été facile, je n'ai pas toujours été de bonne humeur ... je remercie particulièrement **Déborah, Eléo, Mathilde, Tiffany, Camille, Steph, Nico** et tous les autres.

Enfin, mes plus profonds remerciements vont à ma famille. Un immense merci à **mes parents** et **mon frère** de m'avoir supportée pendant ces 3 années. Merci à ma maman d'avoir

toujours pris soin de moi, et d'avoir fait en sorte que je puisse travailler un maximum dans les meilleures conditions. Les derniers mois de cette thèse ont été compliqués à gérer mais on y est arrivé. Alors pour toutes ces raisons et bien plus encore ... je vous dédie cette thèse.

# Table des matières

---

<b>Avant-propos</b> .....	<b>2</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>8</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>10</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>12</b>
<b>Chapitre 1 : Introduction Générale &amp; Objectifs</b> .....	<b>15</b>
<b>Chapitre 2 : Introduction bibliographique</b> .....	<b>22</b>
<b>I. Mécanismes de l'hémostase et de la thrombose</b> .....	<b>24</b>
A. L'hémostase physiologique .....	25
1. Les plaquettes : adhésion, activation et agrégation .....	25
2. La coagulation .....	28
a. La voie extrinsèque (voie <i>in vivo</i> ) .....	29
b. La voie intrinsèque .....	30
c. La voie commune .....	31
B. Physiopathologie de la thrombose .....	32
1. Les neutrophiles .....	34
2. Les monocytes .....	36
<b>II. Les biomatériaux vasculaires pour des applications de contact avec le sang</b> .....	<b>41</b>
A. Les dispositifs implantables .....	43
1. Les endoprothèses vasculaires .....	43
a. Les stents en métal nu .....	44
b. Les stents à élution de médicaments .....	45
c. Les stents biodégradables/résorbables .....	45
2. Les substituts vasculaires .....	46
a. Les vaisseaux natifs .....	47
b. Les vaisseaux synthétiques .....	48
c. Les vaisseaux reconstruits par l'ingénierie tissulaire .....	49
B. La réponse à l'implantation .....	51
1. L'adsorption des protéines plasmatiques .....	52
2. L'activation des cellules du sang .....	54
C. Les stratégies d'optimisation pour l'intégration du dispositif implanté .....	59
1. Amélioration de la biocompatibilité .....	59

a.	Topographie de surface .....	60
b.	Propriétés physico-chimiques de surface .....	60
c.	Modification de surface par recouvrement .....	61
i.	Recouvrement moléculaire .....	61
ii.	Développement de films multicouches .....	62
2.	Développement de polymères spécifiques : le D-PHI.....	64
<b>Chapitre 3 : Résultats &amp; Discussion .....</b>		<b>68</b>
I.	Article 1 .....	69
II.	Article 2 .....	104
III.	Article 3.....	136
<b>Chapitre 4 : Discussion Générale, Conclusions &amp; Perspectives.....</b>		<b>183</b>
<b>Références .....</b>		<b>193</b>
<b>Annexes .....</b>		<b>221</b>
I.	Annex 1: Results related to Article 3 including unpublished O-D-PHI coating.	222
II.	Annex 2: Effect of polyurethane coatings on platelets reactivity.....	234
III.	Annex 3: Effect of polyurethane coatings on neutrophils reactivity .....	237
<b>Listes des articles et communications orales.....</b>		<b>239</b>

# Liste des illustrations

---

**Figure 1 :** Résumé schématique des grandes lignes du projet de thèse

**Figure 2 :** Hémostase : schéma représentant i) l'hémostase primaire, ii) la coagulation plasmatique et iii) la fibrinolyse

**Figure 3 :** Etapes de l'adhésion et de l'activation des plaquettes qui mènent à la formation d'un thrombus

**Figure 4 :** Récepteurs plaquettaires impliqués dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation (ADP : Adénosine diphosphate et TXA<sub>2</sub> : thromboxane A-2)

**Figure 5 :** Hémostase : i) Primaire avec adhésion, activation et agrégation plaquettaire et ii) Coagulation avec formation de fibrine

**Figure 6 :** Schéma de la cascade de coagulation

**Figure 7 :** Les deux modèles de l'initiation de la coagulation : A) model classique et B) modèle alternatif

**Figure 8 :** La triade de Virchow au cours de la thrombose

**Figure 9 :** Intervention des monocytes et des neutrophiles dans l'immuno-thrombose

**Figure 10 :** Mécanismes d'activation du facteur tissulaire : A) dépendant de l'environnement phospholipidique et B) dépendant des réactions d'oxydo-réduction des cystéines.

**Figure 11 :** Différentes étapes du développement de l'athérosclérose

**Figure 12 :** Angioplastie coronarienne avec pose de stent

**Figure 13 :** Représentation d'un pontage vasculaire grâce à l'utilisation d'une veine saphène

**Figure 14 :** Substituts vasculaires synthétiques : a) Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) aussi appelé Goretex® et b) Polyéthylène téréphtalate (PET) aussi appelé Dacron®

**Figure 15 :** Reconstruction vasculaire par ingénierie tissulaire

**Figure 16 :** Divers processus impliqués dans l'interaction sang-biomatériau

**Figure 17** : Effet Vroman : A) Adsorption/désorption de protéines. B) Compétition entre protéines. C) Echange *via* la formation d'un complexe transitoire de deux protéines.

**Figure 18** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Adsorption de protéines et formation d'un thrombus

**Figure 19** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Recrutement des neutrophiles puis des monocytes sur le site d'implantation et différenciation des monocytes en macrophages

**Figure 20** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Formation de cellules géantes à corps étrangers (FBGC) et encapsulation du biomatériau

**Figure 21** : Méthode Layer by Layer (LBL) : construction d'un film multicouche de polyélectrolytes

**Figure 22** : Structure classique et synthèse d'un polyuréthane

**Figure 23** : Représentation schématique des monomères qui composent le D-PHI : A) Acide méthacrylique (MAA), B) Méthacrylate de méthyle (MMA) and C) Divinyl Oligomère (DVO)

**Tableau 1** : Expression du facteur tissulaire *in vivo* et *in vitro* par les différents types cellulaires



# Abréviations

---

AT	Anti-thrombine
BPO	Peroxyde de benzoyle
CoCr	Cobalt Chrome
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
D-PHI	Degradable Polar/Ionic/hydrophobic
DVO	Divinyl oligomère
FBGC	Foreign Body Giant Cell
FBR	Foreign Body Reaction
FDA	Food and drug administration
Fg	Fibrinogène
Fn	Fibronectine
FT	Facteur tissulaire
GP	Glycoprotéine
HHHI	High Hydrophobic, High Ionic
HMWK	Kininogène de haut poids moléculaire
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
KK	Kallikréine
LBL	Layer by layer
LHLI	Low Hydrophobic, Low Ionic
LPS	Lipopolysaccharide
MAA	Acide méthacrylique

MMA	Méthacrylate de méthyle
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle P-9
MPO	Myélopéroxydase
NETs	Neutrophil extracellular traps
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
NO	Oxyde nitrique
O-D-PHI	Original-Degradable/Polar/Hydrophobic/Ionic
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAR	Protease activated receptor
PC	Phosphatidyl choline
PDI	Protéine disulfure isomérase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PET	Polyéthylène téréphtalate
PF4	Platelet Factor 4
PGA	Acide polyglycolique
PK	Prékallikréine
PLA	Acide polylactique
PLGA	Acide poly(lacticoglycolique)
PS	Phosphatidyl Sérine
ePTFE	Polytétrafluoroéthylène expansé
PU	Polyuréthane
ROS	Reactive Oxygen Species
TAT	Thrombine-Anti-thrombine
TCPS	Polystyrène pour culture cellulaire

TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TFPI	Tissue Factor Pathway Inhibitor
TLR	Toll-like Receptors
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
Vn	Vitronectine
VSMC	Cellules musculaires vasculaires lisses
vWF	Facteur de von willebrand

# **Chapitre 1 : Introduction Générale & Objectifs**

---

Les **maladies cardiovasculaires** sont l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Elles constituent un ensemble de pathologies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins tel que l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral, la thrombose veineuse ou encore l'athérosclérose. L'athérosclérose se caractérise par un dépôt de lipides sur la paroi interne des vaisseaux sanguins (plaque d'athérome). A terme, ces plaques peuvent entraîner la lésion de la paroi artérielle (sclérose), conduire à l'obstruction du vaisseau (sténose), ou encore se rompre et conduire à la thrombose. Lorsque le traitement médicamenteux n'est pas envisageable, dû à un état d'avancement trop prononcé de la maladie, une intervention chirurgicale est nécessaire. Elle peut être réalisée par une angioplastie avec pose de stent ou par un pontage vasculaire. Ces deux procédures font appel à l'utilisation de biomatériaux. Il y a donc un réel besoin de mettre au point des dispositifs médicaux biocompatibles permettant une bonne intégration dans le corps.

Lors de l'implantation d'un **biomatériau en contact avec le sang**, un des premiers événements qui se produit à la surface du biomatériau est l'adsorption des protéines. Dans un second temps, les cellules viennent interagir avec la surface du biomatériau par l'intermédiaire des protéines [1]. **L'adsorption des protéines** joue donc un rôle important puisqu'elle dicte, en partie, le comportement des cellules. Cette interaction dépend du type de protéines adsorbées, de leur quantité et de leur conformation, plus précisément, de la disponibilité de certaines séquences spécifiques. L'adsorption des protéines est elle-même dépendante des propriétés de surface du biomatériaux (rugosité, hydrophobie, charge, composition chimique ...) [2,3].

Le succès de l'implantation d'un biomatériau dépend fortement de son niveau de compatibilité qui permettra ou non son intégration dans le corps humain [4]. La biocompatibilité est définie comme « *la capacité d'un matériau à fournir une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique sans effet indésirable* ». Lorsqu'on s'intéresse aux biomatériaux en contact avec le sang, on parle **d'hémocompatibilité**. Ce terme désigne principalement la réponse thrombotique et inflammatoire induite par le biomatériau, appelée **thrombo-inflammation**, qui implique l'activation du système immunitaire inné humoral [5]. Si cette réponse inflammatoire et thrombotique est incontrôlée et inappropriée, elle est susceptible d'entraîner des dommages au biomatériau implanté ou au receveur. Malgré les récents progrès de la recherche sur ces dispositifs, l'une des principales causes d'échec dans l'utilisation des biomatériaux est **la génération d'une thrombose** après contact avec le sang.

Jusqu'à présent la communauté scientifique s'est concentrée sur l'inhibition de l'activation de la coagulation en ciblant l'activation plaquettaire. Cependant, dans le contexte de thrombo-inflammation associée aux biomatériaux, les autres principaux acteurs du sang comme le système du complément et les leucocytes (monocytes, neutrophiles) doivent également être pris en compte. Dans ce contexte, les **monocytes** jouent un rôle primordial car ils se situent à la croisée des chemins entre **l'inflammation et la coagulation** [6,7]. En effet, les monocytes sont les seules cellules du sang capables de synthétiser et exprimer du facteur tissulaire (FT), acteur majeur qui initie l'activation de la voie extrinsèque de la coagulation [7]. Lors de l'inflammation, ils sont également l'un des premiers types cellulaires à arriver sur le site d'implantation où ils sont recrutés et se différencient en macrophages. Ils s'accumulent au site d'inflammation et produisent des cytokines inflammatoires qui contribuent à l'inflammation locale et systémique [8].

Pour essayer de répondre à ces problèmes d'hémocompatibilité, des **polymères** sont développés dans le but de réduire non seulement l'activation plaquettaire mais également leucocytaire. En effet, ceux-ci possèdent des propriétés physico-chimiques modulables et sont présentés, pour certains, comme biocompatibles pour des applications de contact avec le sang.

C'est donc dans ce contexte que s'insère le travail de cette thèse qui s'est concentré sur l'étude de la biocompatibilité de polyuréthanes spécifiques développés pour des implants biomédicaux. Le groupe du docteur J P Santerre (Canada) a mis au point un **polyuréthane polyfonctionnel** (appelé D-PHI, ou Degradable Polar/Hydrophobic/Ionic) dans le but de réduire la réponse inflammatoire des monocytes [9,10]. Ce D-PHI contient, dans sa formule originale (**O-D-PHI**), un oligomère de divinyl polycarbonate-lysine uréthane (DVO), de l'acide méthacrylique (MAA) et du méthacrylate de méthyle (MMA). Il est obtenu par une réaction de polymérisation radicalaire grâce à un initiateur de polymérisation, le peroxyde de benzoyl (BPO). Des études précédentes ont montré que le O-D-PHI était biocompatible et non toxique pour plusieurs types de cellules lorsqu'il est utilisé dans l'ingénierie des tissus vasculaires tels que les cellules musculaires vasculaires lisses [9], les cellules endothéliales [11], les fibroblastes [12] et les monocytes [10]. La chimie de la structure en bloc du D-PHI peut être modulée en faisant varier la teneur en monomère hydrophobe et anionique par rapport à la teneur en DVO. Les caractères polaire, hydrophobe et ionique offrent l'opportunité d'afficher diverses distributions de groupements chimiques sur des surfaces de matériaux dans différents environnements et pourraient interagir de manière différentielle avec les protéines et les cellules du sang. Ainsi, la formulation **HHHI** (High Hydrophobic, High Ionic) a été développée.

L'objectif de la première étude de ce manuscrit (**Article 1**) a été d'étudier l'influence de la chimie intrinsèque des matériaux de D-PHI (O-D-PHI et HHHI) sur l'adsorption et la disponibilité de séquences spécifiques d'une protéine plasmatique, la fibronectine (Fn), adsorbée en monocouche ou en multicouche (Poly-L-Lysine/Fn). L'activation des monocytes sur ces 2 polyuréthanes fonctionnalisés ou non par la Fn (monocouche, multicouche) a ensuite été étudiée. Ce travail vise à mieux comprendre la relation qu'il existe entre la composition chimique du D-PHI, le réarrangement protéique de la Fn et l'activation des monocytes. Les résultats ont mis en évidence que :

- i) La chimie intrinsèque du D-PHI influence l'adsorption et la disponibilité des séquences de la Fn ; ainsi que l'état d'activation des monocytes, les monocytes étant plus activés sur le HHHI comparé au O-D-PHI**
- ii) La présence de Fn en mono ou multicouche n'a montré aucune incidence sur l'activation des monocytes**

La seconde partie de ce travail de thèse (**Article 2**) a eu pour objectif de développer des films minces de polyuréthane micrométriques dans le but de recouvrir des surfaces de cobalt-chrome (CoCr). Le CoCr est un alliage métallique que l'on retrouve majoritairement dans la composition des stents. Il présente de nombreux avantages (non magnétique, résistant à l'usure, à la corrosion et à la chaleur ...) [13,14] mais présente des propriétés pro-thrombotiques et pro-inflammatoires [15,16], d'où la nécessité d'améliorer la biocompatibilité de ce support. La stratégie mise en place dans cette étude est donc de générer des films minces de polyuréthane (O-D-PHI et HHHI) grâce à l'utilisation d'un solvant, le tétrahydrofurane (THF). La caractérisation physico-chimique des films minces a été réalisée afin de mieux comprendre l'influence de l'utilisation de ce solvant sur la structuration et l'organisation moléculaire des polyuréthanes au contact du CoCr. De plus, une étude du comportement de 2 protéines plasmatiques, l'immunoglobuline G (IgG) et la Fn, sur ces surfaces a été effectuée car la manière dont les protéines s'adsorbent peut jouer un rôle dans l'activation cellulaire. Les résultats montrent que :

- i) La dilution des solutions de polyuréthane dans un solvant polaire a permis d'obtenir, de manière reproductible, des films minces uniformes d'environ 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur à la surface du CoCr**
- ii) Les propriétés physico-chimiques de ces films minces comparées aux matériaux épais ne sont que légèrement modifiées**

**iii) L'exposition de séquences spécifiques de protéines (Fn et IgG), impliquées dans la coagulation et l'inflammation est diminuée sur les films minces de D-PHI**

Enfin, la dernière partie de cette thèse (**Article 3**) a consisté en l'étude de la réactivité des cellules du sang au contact de ces films minces de polyuréthane (HHHI) déposés à la surface de CoCr sous forme de films micrométriques. Plus particulièrement, l'objectif a été de vérifier si ces revêtements sont capables de masquer les effets pro-thrombotiques et pro-inflammatoires du CoCr. Dans un premier temps, une étude de l'activation de la coagulation du sang total au contact de ces biomatériaux a été réalisée. Puis dans un deuxième temps, le comportement des cellules individuelles (monocytes / macrophages) a été étudié afin d'expliquer les résultats obtenus en sang total. Les résultats mettent en évidence que :

- i) L'interaction du sang total avec du CoCr conduit à l'activation de la coagulation avec génération de thrombine, formation de complexe thrombine-anti-thrombine et formation d'un réseau intense de fibrine**
- ii) Le recouvrement du CoCr avec les films minces de HHHI prévient l'activation de la coagulation**
- iii) Les monocytes au contact du CoCr s'activent fortement : modification de leur morphologie, génération de thrombine, expression de FT, activation de NF- $\kappa$ B et sécrétion de cytokines. Les macrophages au contact du CoCr sont également activés (morphologie et sécrétion de cytokines)**
- iv) Le recouvrement du CoCr avec les films de HHHI prévient l'activation des monocytes et des macrophages**

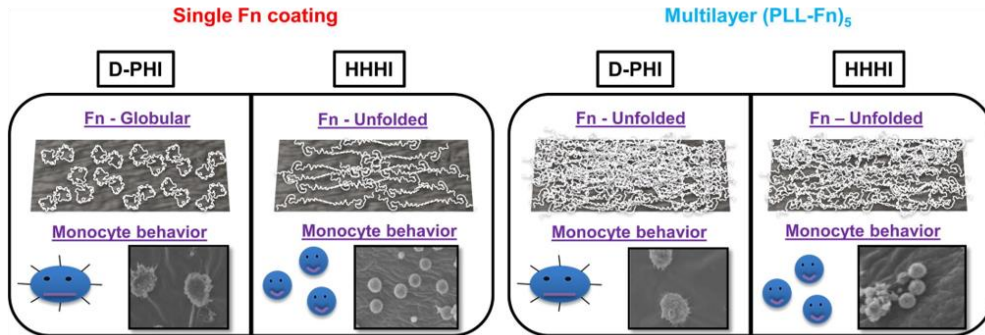
Tous ces résultats mettent donc évidence que les films minces de D-PHI réduisent le phénotype pro-thrombotique et pro-inflammatoire des monocytes et des macrophages induit par le CoCr ainsi que l'activation de la cascade de coagulation menant à la formation d'un réseau de fibrine.

Les résultats de ces 3 articles ont mis en évidence l'importance de la chimie intrinsèque des biomatériaux à base de polyuréthane. La diversité chimique présente au sein de ces biomatériaux a permis une adsorption de protéines (Fn et IgG) et une exposition de peptides favorable lorsqu'on s'intéresse à l'inflammation et la coagulation. La caractérisation de surface a mis en évidence que l'utilisation d'un solvant pour générer des films minces de D-PHI a

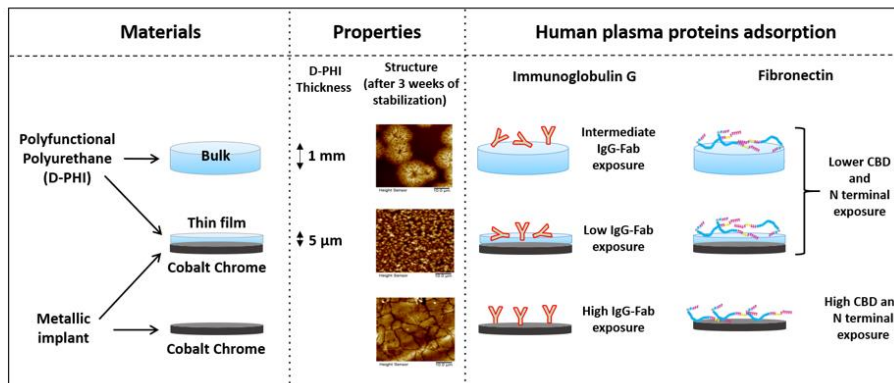


légèrement modifié les surfaces comparées au matériau de base (épais). Enfin les films minces de quelques micromètres d'épaisseur ont permis de masquer les effets pro-thrombotiques et pro-inflammatoires du CoCr en réduisant de manière importante l'activation du sang et en particulier des monocytes.

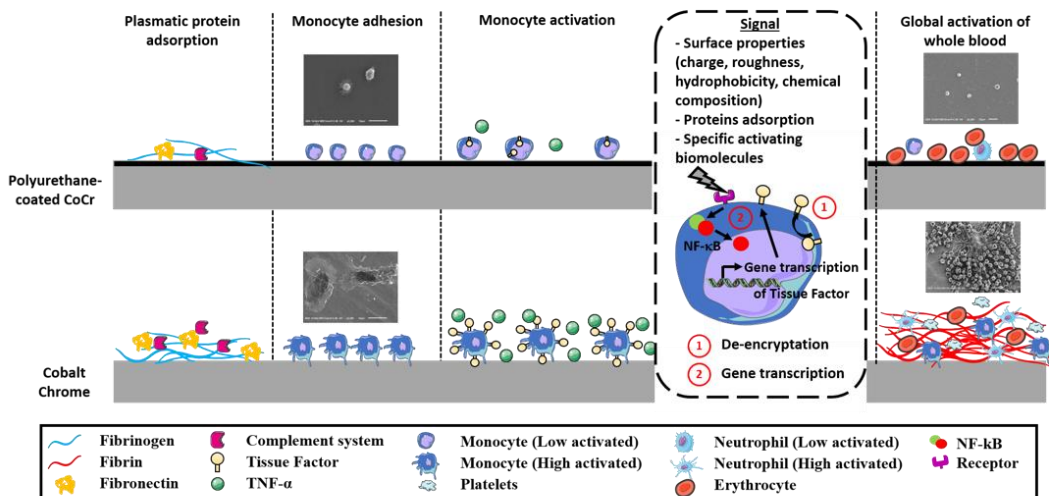
**Article 1 : Mono vs Multilayer Fibronectin Coatings on Polar / Hydrophobic / Ionic Polyurethanes: Altering Surface Interactions with Human Monocytes**



**Article 2 : Coating of cobalt chrome substrates with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: characterization and interaction with human immunoglobulin G and fibronectin**



**Article 3 : Mitigation of monocyte driven thrombosis on Cobalt Chrome surfaces in contact with whole blood by thin film polar/hydrophobic/ionic polyurethane coatings**



**Figure 1 : Résumé schématique des grandes lignes du projet de thèse**

## **Chapitre 2 : Introduction bibliographique**

La **biocompatibilité** est définie comme : "*la capacité générale d'un matériau à fournir une réponse appropriée de l'hôte dans une application spécifique*". Dans le cas des dispositifs vasculaires, la relation singulière et idéale entre le matériau et le tissu sanguin est désignée sous le terme d'**hémocompatibilité**.

Dans des conditions physiologiques normales, les cellules possèdent à leur surface des inhibiteurs physiologiques permettant un contrôle des mécanismes cellulaires et une régulation de l'organisation tissulaire. Dans le cas de la présence d'un biomatériau synthétique, leur surface étant dépourvue de ces inhibiteurs, des processus spécifiques de réponse thrombotique et inflammatoire se mettent en place, on parle alors de **thrombo-inflammation** [5]. Ce terme désigne un processus complexe impliquant l'activation du système immunitaire inné humoral qui est constitué des systèmes du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse.

L'activation des différents systèmes biologiques va entraîner l'activation des plaquettes, des leucocytes et des cellules endothéliales qui tapissent la paroi vasculaire. Ces réponses thrombotiques et inflammatoires sont susceptibles d'entraîner des dommages à la fois au biomatériau implanté et au receveur. Ce processus est donc un obstacle majeur à l'utilisation de biomatériaux en contact avec le sang notamment dans le domaine cardiovasculaire et bien que de nombreux biomatériaux soient déjà utilisés, aucun n'est totalement compatible avec le sang sans entraîner d'effet indésirable. Ceci peut s'expliquer en partie par une connaissance incomplète de la manière dont les biomatériaux peuvent induire une activation des composants du sang. De nombreuses études ont porté sur l'ingénierie des biomatériaux dans le but d'améliorer leur hémocompatibilité et d'établir des critères d'évaluation de cette biocompatibilité [6,17,18].

L'objectif du travail de recherche développé dans cette thèse a pour objectif de proposer, *via* l'utilisation de polyuréthanes spécifiques, des stratégies de modifications de dispositifs métalliques optimisés pour interagir avec le sang et les cellules vasculaires.

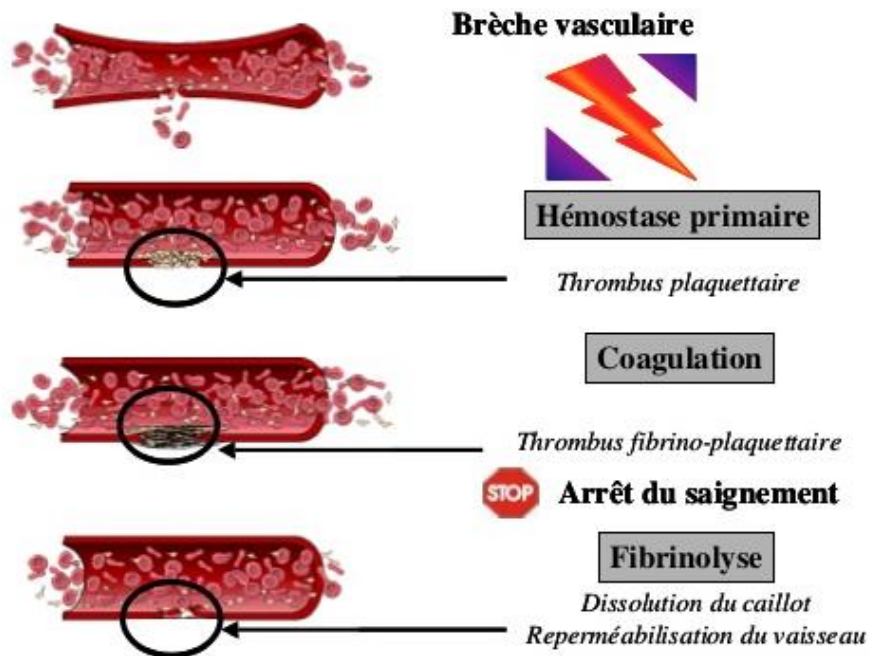
Dès lors, il apparaît nécessaire d'avoir une vue générique et une connaissance approfondie sur l'état de l'art concernant :

I. Les **mécanismes** cellulaires et moléculaires de **l'hémostase et de la thrombose**

II. Les **biomatériaux** actuels et les techniques de modifications de surface mises en œuvre pour des applications dans le domaine **cardiovasculaire** ainsi que leur **interaction avec le sang**.

## I. Mécanismes de l'hémostase et de la thrombose

L'**hémostase** correspond à l'ensemble des processus physiologiques permettant de maintenir l'intégrité vasculaire et la fluidité du sang. Elle se décompose classiquement en 3 phases (**Figure 2**) (i) l'**hémostase primaire** qui comprend l'ensemble des interactions plaquettes-vaisseaux sanguins, (ii) la **coagulation** qui correspond à l'ensemble des mécanismes permettant la transformation du fibrinogène plasmatique soluble en un réseau de fibrine insoluble, et (iii) la **fibrinolyse** qui est l'étape de dégradation du thrombus pour rétablir des conditions normales de circulation du sang et la cicatrisation.



**Figure 2** : Hémostase : schéma représentant i) l'hémostase primaire, ii) la coagulation plasmatique et iii) la fibrinolyse

Hémostase primaire et coagulation sont, *in vivo*, des réactions concomitantes et interconnectées. Les mécanismes de l'hémostase nécessitent une régulation précise afin de ne pas converger vers un processus pathologique, à savoir une activation inadaptée ou excessive, aboutissant à une maladie hémorragique ou thrombotique. La thrombose est un processus pathologique responsable de la formation inappropriée d'un thrombus pouvant aboutir à

l'occlusion partielle ou totale d'un vaisseau. Les conséquences cliniques de la thrombose peuvent être désastreuses et représentent un taux élevé de mortalité dans le monde.

## A. L'hémostase physiologique

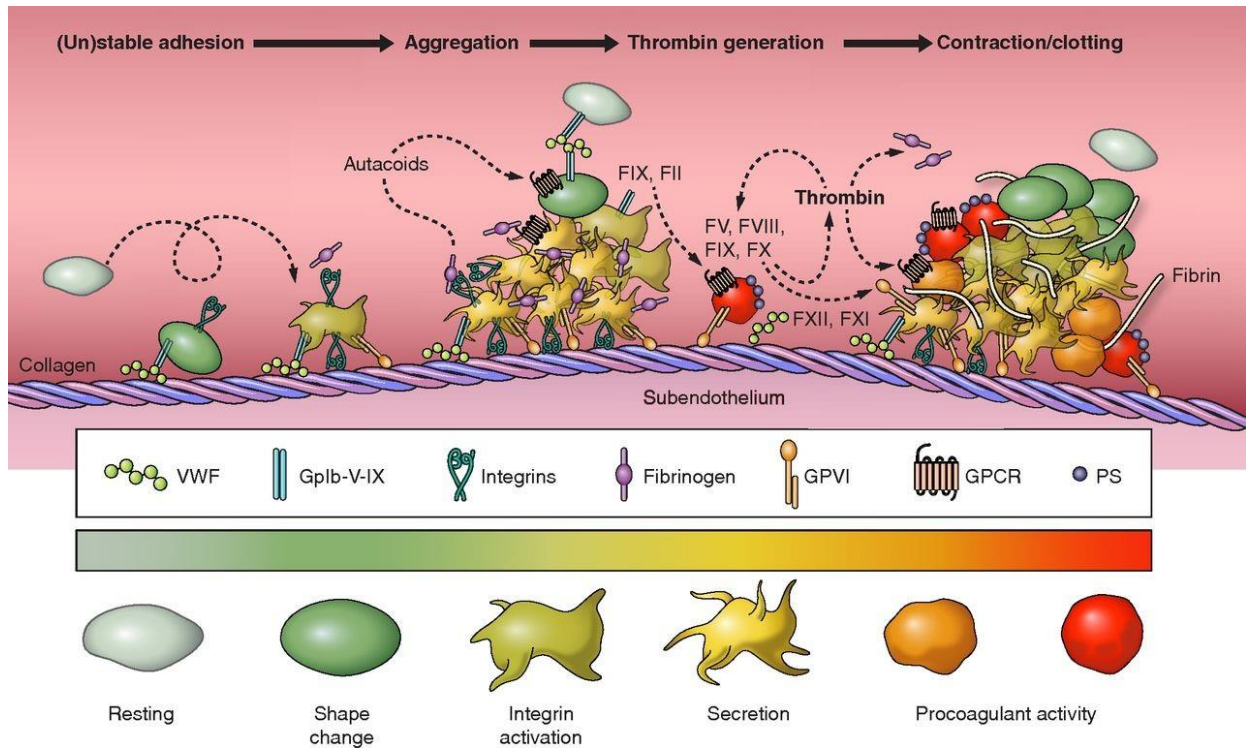
Le système hémostatique comprend deux mécanismes principaux, **l'adhésion et l'agrégation plaquettaire** (hémostase primaire) et la **formation d'un réseau de fibrine** (coagulation). Ces deux processus seront décrits de façon distincte bien qu'ils soient en réalité étroitement liés.

### 1. Les plaquettes : adhésion, activation et agrégation

**L'hémostase primaire** est rapidement mise en place lors d'une brèche vasculaire, elle débute par une vasoconstriction localisée pour permettre une réduction du flux sanguin et la formation d'un **agrégat plaquettaire** (clou plaquettaire) qui va colmater la brèche. La formation de ce clou plaquettaire implique trois étapes : **l'adhésion, l'activation et l'agrégation** des plaquettes qui ont donc un rôle primordial (*Figure 3*).

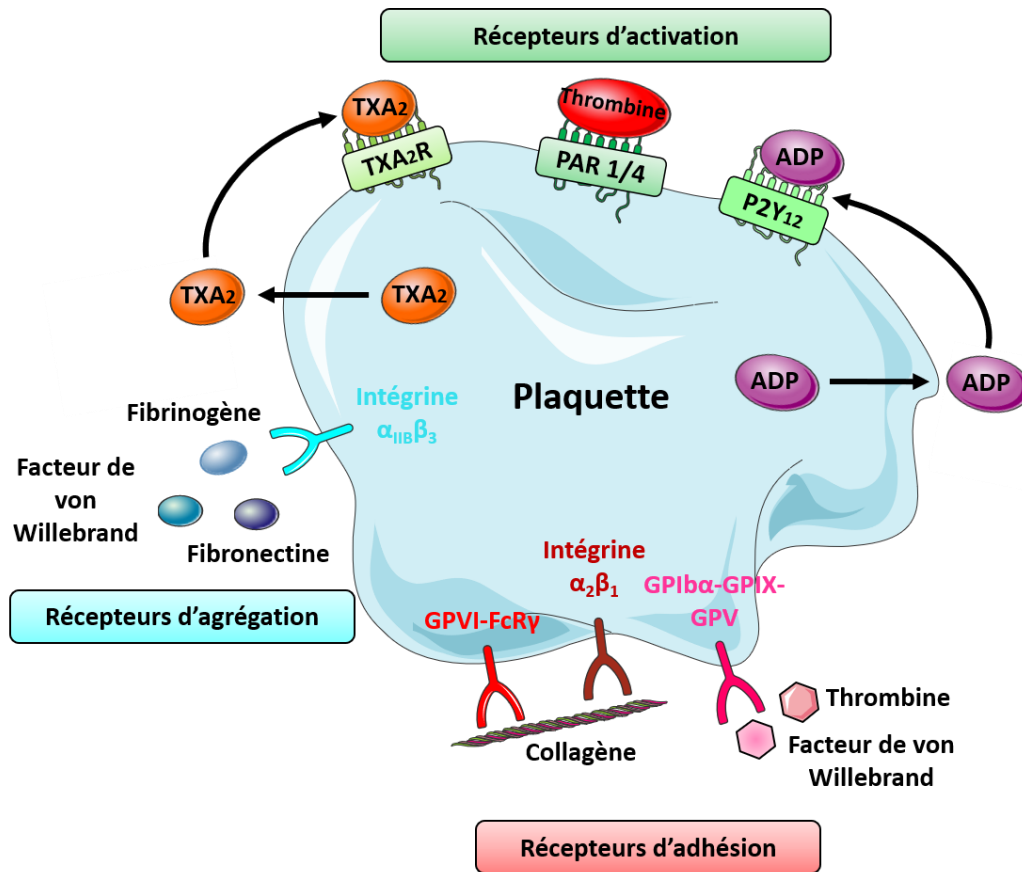
Les **plaquettes** sont dépourvues de noyau et, au repos, ont une forme discoïdale et un diamètre de 2 à 4  $\mu\text{m}$  [19]. Elles sont fabriquées dans la moelle osseuse par les mégacaryocytes [20] et circulent dans le sang avec une concentration comprise entre 150 000 et 450 000  $/\mu\text{L}$ . Leur durée de vie est d'environ 10 jours.

Les plaquettes contiennent dans leur cytoplasme trois types de **granules de sécrétion** [21]. Les **granules alphas** sont majoritaires et contiennent des facteurs impliqués dans l'hémostase et dans l'adhésion nécessaires à l'arrêt du saignement (facteurs V, IX, XIII, fibrinogène (Fg), facteur von Willebrand (vWF)), des facteurs de croissance (vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet-derived growth factor (PDGF)...) utiles pour la cicatrisation et des médiateurs immuns (précurseurs C3 et C4 du complément, immunoglobuline G (IgG)). Les **granules denses** contiennent de la sérotonine, une amine vasoactive, du calcium, des nucléotides comme l'ADP et l'ATP et des polyphosphates. Le dernier groupe de granules, les **lysosomes**, contiennent des enzymes qui dégradent les protéines (cathepsines, élastase et collagénase) et les sucres, ainsi que des phosphatases acides [22].



**Figure 3 :** *Etapes de l'adhésion et de l'activation des plaquettes qui mènent à la formation d'un thrombus [23]*

La membrane plaquettaire est majoritairement composée de phospholipides et de nombreux récepteurs membranaires qui interviennent dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes répondent à une stimulation minimale et s'activent lorsqu'elles entrent en contact avec une surface thrombogène telle que l'endothélium activé ou lésé qui expose des protéines de la matrice extracellulaire (collagène, vWF...) ou avec une surface artificielle. Les **récepteurs d'adhésion plaquettaires** mis en jeu sont la glycoprotéine VI (GPVI FcRy) et l'intégrine  $\alpha_2\beta_1$  [24] pour l'adhésion des plaquettes au collagène (**Figure 4**) et le complexe GPII $\alpha$ -GPIX-GPV pour l'adhésion au vWF.



**Figure 4 : Récepteurs plaquettaires impliqués dans l'adhésion, l'activation et l'agrégation** (ADP : Adénosine diphosphate et TXA<sub>2</sub> : thromboxane A2)

L'**activation plaquettaire** implique un changement de forme (formation de pseudopodes), une sécrétion dans le plasma du contenu des granules et un changement de conformation de l'intégrine α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> (GP IIb/IIIa) qui va augmenter son affinité pour le Fg. Les récepteurs d'activation (**Figure 4**) sont le récepteur au thromboxane A2 (TXA<sub>2</sub>R), les récepteurs de la thrombine (protease activated receptor 1 and 4, PAR1/4) et le récepteur à l'ADP, P2Y<sub>12</sub>. D'autre part, lors de l'activation, les phospholipides membranaires des plaquettes vont subir une inversion d'exposition, « flip-flop », ce qui va permettre une exposition de charges négatives sur la membrane externe et favoriser l'assemblage des complexes Ténase (FVIII et FIXa) et Prothrombinase (FXa et FVa) de la coagulation à la surface des plaquettes qui acquièrent alors une activité pro-coagulante.

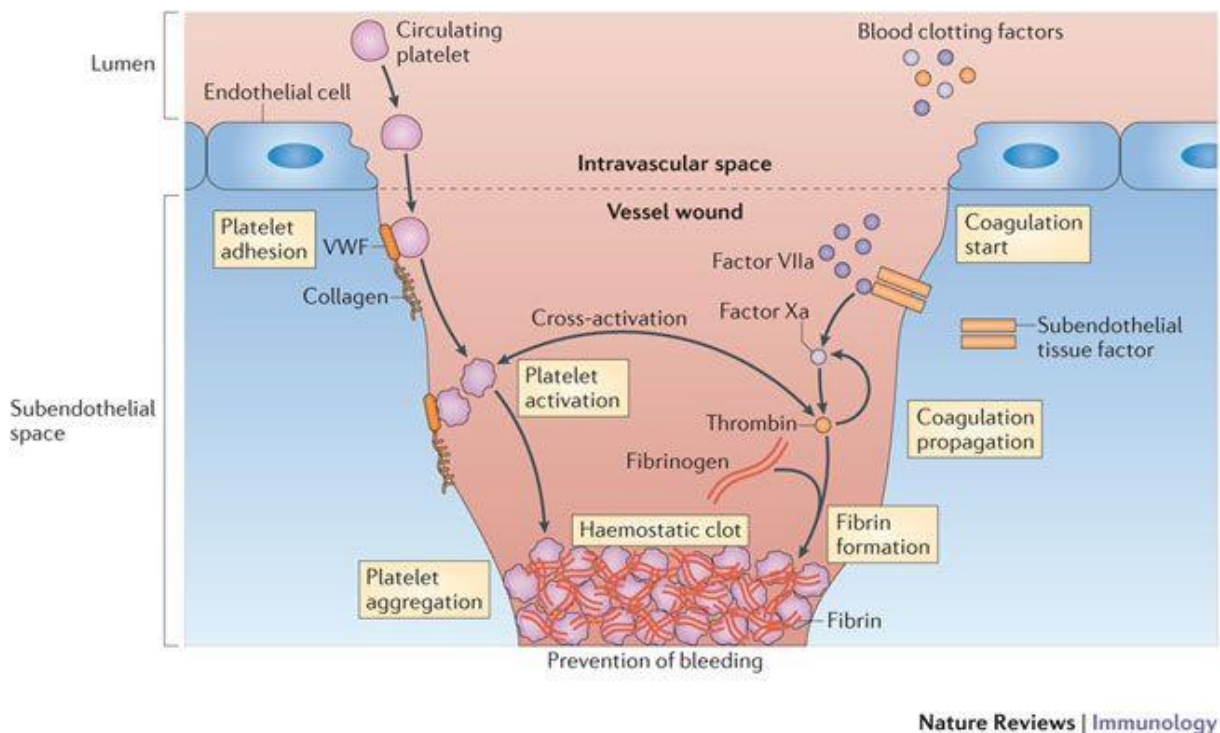
L'activation plaquettaire induite par différents agonistes (ADP, thromboxane A2...) transforme l'intégrine α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> [25] en un récepteur de forte affinité pour le Fg et le vWF (**Figure 4**). Les molécules de Fg forment des ponts entre les intégrines α<sub>IIb</sub>β<sub>3</sub> plaquettaires, c'est le



phénomène **d'agrégation plaquettaire**. Dès cette phase commence l'étape de la coagulation concomitante à l'hémostase primaire pour consolider le clou plaquettaire.

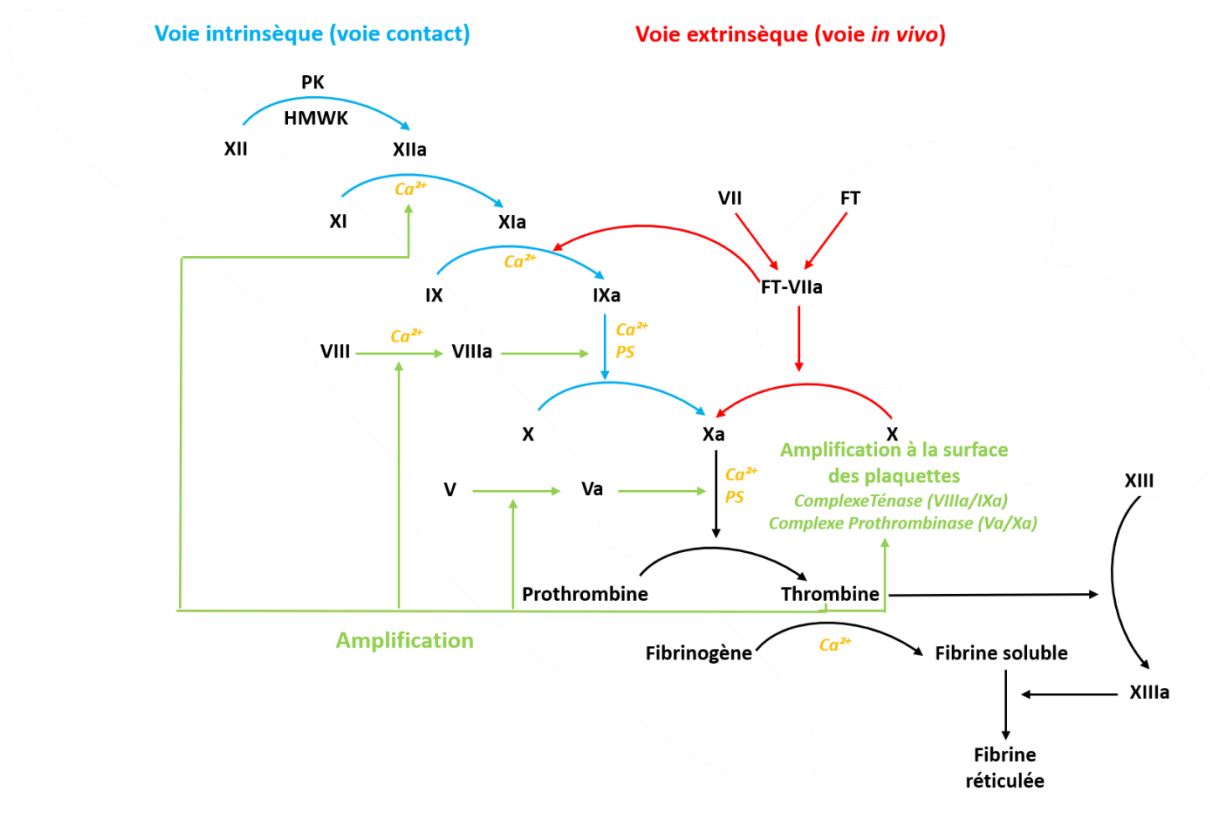
## 2. La coagulation

L'hémostase secondaire, ou **coagulation plasmatique**, a lieu simultanément et de manière complémentaire à l'hémostase primaire comme le montre la **Figure 5** [25].



**Figure 5 : Hémostase : i) Primaire avec adhésion, activation et agrégation plaquettaire et ii) Coagulation avec formation de fibrine [26].**

L'agrégation plaquettaire permet de colmater rapidement la brèche vasculaire mais est instable, fragile et dans l'incapacité de maintenir l'hémostase à elle seule. Pour stabiliser et consolider le clou plaquettaire, la **formation d'un réseau de fibrine** est essentielle. Pour cela, une cascade de réaction enzymatique est déclenchée, qui fait intervenir l'activation de différents facteurs plasmatiques de la coagulation (zymogènes) et va permettre la transformation du Fg en fibrine insoluble sous l'action de la thrombine générée [23]. Cette **cascade de la coagulation** est initiée soit par le facteur tissulaire (FT) (voie extrinsèque), soit par des surfaces chargées négativement (voie intrinsèque ou voie contact). Ces deux voies ont pour objectif commun la production de thrombine (**Figure 6**).



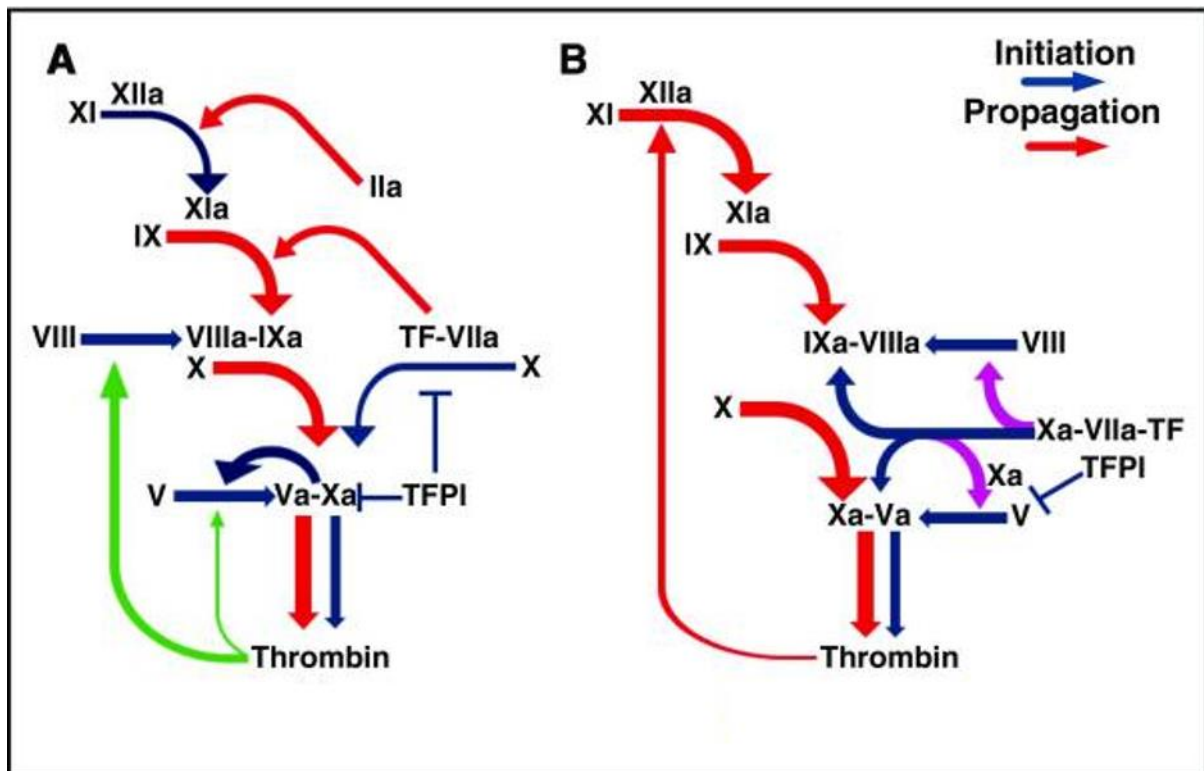
**Figure 6 : Schéma de la cascade de coagulation**

**a. La voie extrinsèque (voie *in vivo*)**

L'initiateur physiologique de la **voie extrinsèque** de la coagulation (aussi appelée voie *in vivo*) est le **facteur tissulaire** (FT). Le FT est une protéine transmembranaire et un récepteur de haute affinité pour les facteurs VII (FVII) et VII activé (FVIIa) [27]. Le FT est nécessaire au positionnement du site catalytique du FVIIa au niveau de la membrane plasmatisque ce qui permet une interaction optimale avec ses substrats, les facteurs IX et X. Le complexe FT-FVIIa active donc le FX (FXa) qui va induire la génération des premières traces de thrombine à partir de la prothrombine [21,28].

Cette voie extrinsèque est décrite depuis de nombreuses années. Cependant, des études récentes mettent en évidence un **modèle de la coagulation** légèrement différent du modèle traditionnel (**Figure 7**) [7,29]. Une étude vient de démontrer que le complexe FT/FVIIa pouvait initier non seulement la voie extrinsèque de la coagulation mais également la voie intrinsèque.

En effet, le FXa nouvellement produit par le complexe FT-FVIIa peut directement activer le **FVIII** et ceci de façon indépendante à la génération de thrombine qui serait improbable dans un environnement pauvre en FT où l'inhibiteur de la voie du facteur tissulaire (TFPI) inhiberait rapidement le complexe FT-FVIIa-FXa. L'activation du FIX effectuée simultanément par ce même complexe permet l'assemblage du complexe Ténase (FVIIIa-FIXa) qui peut favoriser l'hémostase avant une amplification de la coagulation par la thrombine ce qui pourrait augmenter le risque de thrombose [30,31].



**Figure 7** : Les deux modèles de l'initiation de la coagulation : A) model classique et B) modèle alternatif (Adapté de Kamikudo Y. et al., 2017) [30]

### b. La voie intrinsèque

Le **système contact** est constitué par un groupe de protéines qui sont toutes activées par le facteur XII activé (FXIIa). Ces protéines sont soit pro-inflammatoires, soit pro-coagulantes. **L'activation du FXII** est déclenchée par le contact avec des surfaces chargées négativement (*in vitro* : verre, kaolin ; *in vivo* ; collagène, tissu conjonctif), ce qui va induire un changement

de conformation du FXII permettant une auto-activation non protéolytique de la molécule en une forme enzymatiquement active, le FXIIa [5]. Le FXIIa catalyse la conversion de la prékallikréine (PK) en kallikréine (KK) grâce à son association avec le cofacteur kininogène de haut poids moléculaire (HMWK) ; et active le FXI. La kallikréine et le FXIIa sont ensuite amplifiés par des réactions réciproques [21]. L'inflammation est dépendante de la production de bradykinine après digestion du HMWK par la PK. La coagulation (voie intrinsèque) est déclenchée par l'activation du FXI par le FXIIa. Le FXI activé (FXIa) va lui aussi activer le FIX, ce qui peut aboutir à la génération thrombine et à la formation d'un caillot. En parallèle, la PK va activer le plasminogène en plasmine, ce qui va activer la fibrinolyse. Enfin la voie du complément C1 est également activée par le FXIIa. L'inhibiteur de la C1 estérase (C1INH) est d'ailleurs l'inhibiteur principal du FXIIa [32].

La voie intrinsèque est initiée *in vitro* par contact avec une surface chargée négativement [19,21]. *In vivo*, l'importance de cette voie dans la coagulation sanguine normale est moins évidente. Le collagène présent dans le sous-endothélium après lésion vasculaire pourrait constituer la surface nécessaire à cette réaction et initier la voie intrinsèque [33]. Néanmoins, des études ont montré que les patients déficitaires en FXII, PK et HMWK, facteurs essentiels de la voie intrinsèque, ne présentent pas de saignements anormaux [34,35] ce qui suggère que cette voie n'est pas la voie dominante *in vivo* [25,33].

### c. La voie commune

Les voies intrinsèque et extrinsèque convergent vers la même voie appelée voie commune afin de générer un maximum de thrombine, ce qui permet la **transformation du fibrinogène en fibrine** et l'activation du facteur XIII (transglutaminase ou FXIIIa), qui entraîne la génération d'un caillot de fibrine réticulé insoluble. Les premières traces de thrombine générées (par le FXa produit par le complexe FT-FVIIa, par exemple) permettent l'activation des plaquettes. On parle alors **d'amplification de la coagulation**.

**La propagation** de la coagulation va se poursuivre à la surface des **plaquettes activées** qui exposent alors des phospholipides chargés négativement (phosphatidylsérine) ce qui favorise, en présence de calcium, l'assemblage des complexes Ténase (FVIII et FIXa) et Prothrombinase (FXa et FVa) à leur surface. Le complexe Ténase va permettre la génération

d'une quantité importante de FXa et le complexe Prothrombinase va induire une génération de thrombine suffisante pour transformer le fibrinogène en fibrine et amplifier la coagulation en activant en retour les facteurs V, VIII et XI [36].

La balance hémostatique est maintenue grâce à la présence de nombreux **inhibiteurs** qui préviennent une coagulation excessive et/ou incontrôlée qui mènerait à la thrombose. Parmi ces inhibiteurs, le premier est l'inhibiteur de la voie du FT, le TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), qui se lie au complexe FT/FVIIa/FXa. Le système de la protéine C (PC) constitue également une autre sécurité. Lorsque la thrombine est générée, elle peut se lier à la thrombomoduline, qui est un récepteur situé sur l'endothélium, et le complexe ainsi formé va activer la PC qui est liée sur son propre récepteur endothélial (EPRC). La PC activée va ensuite inactiver les FVIIa et FVa [37]. Mais l'inhibiteur principal est l'antithrombine (AT) qui est capable de bloquer la thrombine mais également les FXa, IXa et VIIa.

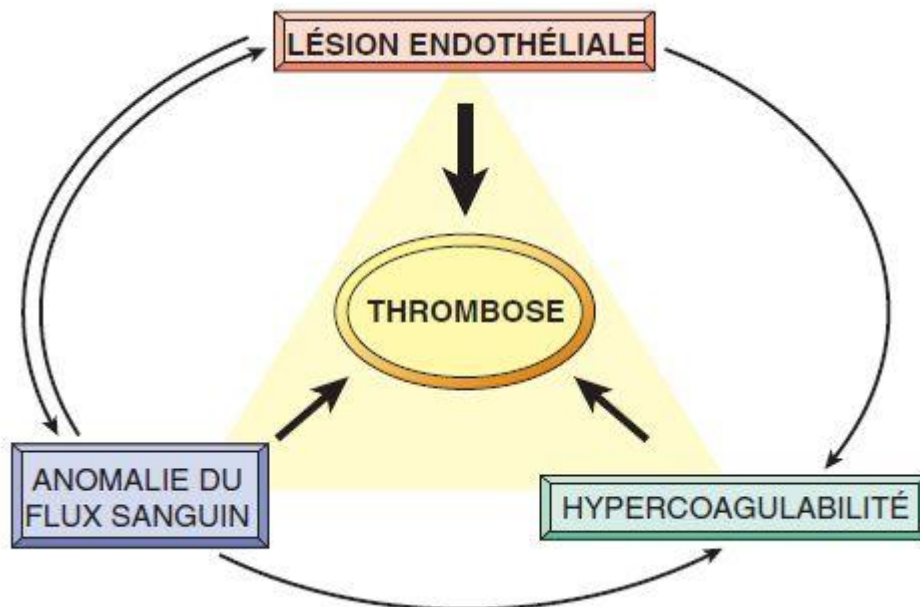
## **B. Physiopathologie de la thrombose**

La **thrombose** est un processus considéré comme une déviation pathologique de l'hémostase. Elle est responsable de la formation d'un thrombus dans la lumière vasculaire qui peut occlure partiellement ou totalement le vaisseau, ou migrer dans le flux sanguin et ainsi provoquer une embolie pulmonaire ou un accident vasculaire cérébral.

Les facteurs déclenchant l'activation de la cascade de la coagulation et de l'agrégation plaquettaire sont différents dans l'hémostase et la thrombose. Lors d'une **brèche vasculaire**, c'est principalement l'exposition du collagène, du vWF et du FT qui déclenche la formation d'un caillot. Dans ce cas, les cellules endothéliales ont pour rôle de contenir le clou plaquettaire au colmatage de la brèche en inhibant l'extension de l'agrégation plaquettaire.

Concernant la thrombose vasculaire, le docteur Rudolf Virchow a décrit, en 1856, 3 causes principales favorisant l'apparition d'une thrombose : c'est la **triade de Virchow (Figure 8)**. Le **premier facteur** est **pariétal** et consiste en une altération de la paroi vasculaire aboutissant soit à une interruption de l'endothélium, ce qui entraîne un contact entre le sang et les protéines de la matrice extracellulaire, soit une activation de l'endothélium qui devient thrombogène. Les causes de cette lésion pariétale sont nombreuses : traumatismes, turbulences

circulatoires, inflammation, athérosclérose. Le **deuxième facteur** est **hémodynamique** et en particulier, un ralentissement du flux sanguin favorise la formation de thromboses. L'hypoxie, causée par la stase sanguine, génère également une souffrance endothéliale. Enfin, la stase favorise l'extension des micro-thromboses. Ce phénomène d'altération du flux sanguin peut être causé par un alitement, un plâtre, des varices, un anévrisme ou encore une hypotension. Enfin, le **troisième facteur** est **sanguin** et correspond à un état pro-thrombotique où l'hypercoagulabilité est due à une altération des voies de la coagulation. Les principales causes sont : les maladies génétiques ou acquises de la coagulation sanguine, les états d'hyperviscosité (polyglobulie par exemple), l'hypercholestérolémie.



**Figure 8 :** *La triade de Virchow au cours de la thrombose : L'intégrité de l'endothélium (facteur pariétal) est l'élément principal. Une agression de l'endothélium peut aussi modifier le flux circulatoire local (facteur hémodynamique) et la coagulabilité (facteur sanguin). De leur côté, des modifications du flux sanguin (turbulences, stase) peuvent être responsables de lésions endothéliales. Ces facteurs peuvent être isolés ou interagir pour entraîner la formation d'un thrombus.*

Contrairement à l'hémostase physiologique, la thrombose fait intervenir plusieurs acteurs cellulaires et moléculaires tels que les monocytes et les neutrophiles. En effet, les mécanismes et éléments aboutissant à la formation d'un thrombus ne se limitent pas à la fibrinogenèse et à l'agrégation plaquettaire. L'activation du système immunitaire influence aussi fortement la coagulation et la formation du thrombus. **La participation des cellules de l'immunité innée à la formation du thrombus serait une caractéristique spécifique de la thrombose** [26]. Les leucocytes activés, monocytes/macrophages et polynucléaires neutrophiles, peuvent exprimer du FT et/ou sécréter des molécules pro-inflammatoires ou pro-coagulantes. Ces médiateurs influencent la formation du thrombus (adhésion et activation plaquettaire, activation des voies intrinsèque et extrinsèque de la coagulation). Les leucocytes sont recrutés au sein du thrombus en formation soit *via* des interactions avec les récepteurs plaquettaires et endothéliaux, P-selectin par exemple, soit par l'action des chimiokines libérées par les plaquettes qui permettent le recrutement des cellules immunitaires [38,39]. Il a été montré que les monocytes et les neutrophiles peuvent soutenir la génération de thrombine sur le site de la lésion vasculaire pour perpétuer et amplifier la thrombose après l'activation des plaquettes [40].

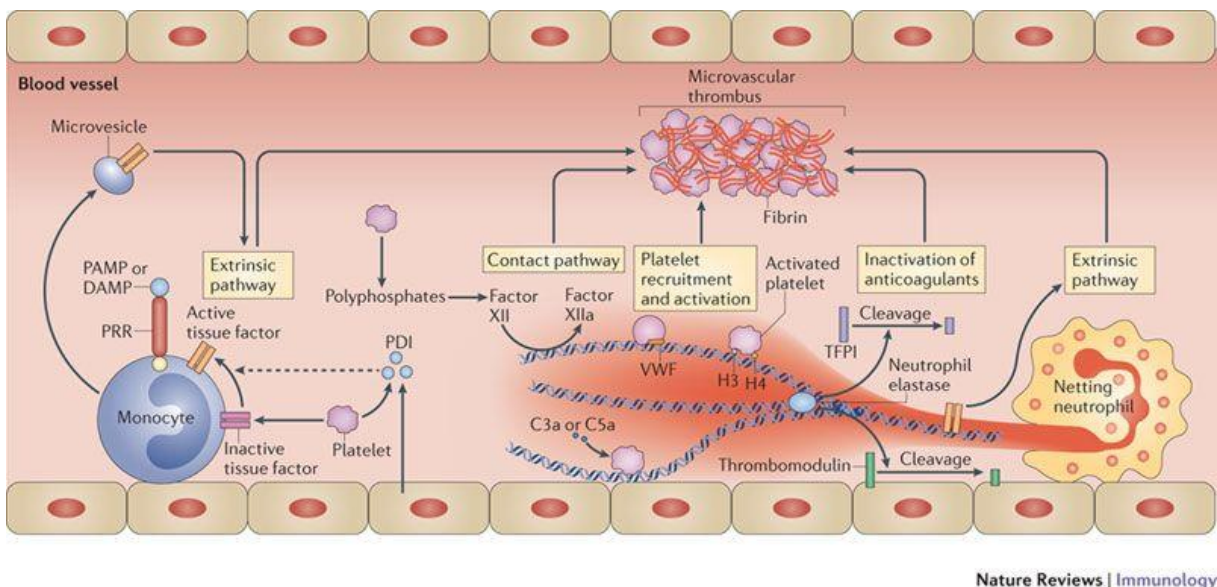
### 1. Les neutrophiles

Les **polynucléaires neutrophiles** sont des cellules sphériques possédant un noyau polylobé. Ils représentent 40 à 60% des leucocytes totaux et possèdent dans leur cytoplasme différents types de granules [41]. On distingue les **granules primaires** (azurophiles) qui contiennent notamment l'élastase et la myéloperoxydase (MPO). Les **granules secondaires** (spécifiques) qui contiennent, entre autres, la collagénase et la lactoferrine. Les **granules tertiaires** (gélatinases) qui contiennent, par exemple, la métalloprotéinase matricielle P-9 (MMP-9) et la leucolysine. Enfin les vésicules sécrétoires qui contiennent les récepteurs comme CD11b/CD18 (Mac-1) ou récepteur du complément CR3. Dans des conditions physiologiques, les neutrophiles ont une demi-vie très courte dans le sang d'environ 8 à 20h. Cependant, après un stimulus inflammatoire (endotoxine bactérienne ou cytokines, par exemple) leur durée de vie peut être multipliée par 3 [42].

Les neutrophiles sont fortement impliqués dans les processus de thrombose. En conditions pro-inflammatoires, les neutrophiles libèrent des **métalloprotéinases matricielles**



et des **sérines protéases** comme la cathepsine G et l'élastase [43]. Ces enzymes peuvent activer directement les facteurs de la coagulation V, VIII et X [44–46] et en parallèle dégrader les inhibiteurs comme l'anti-thrombine ou le TFPI [47,48]. Un autre mécanisme important en ce qui concerne l'implication des neutrophiles dans le processus de thrombose est la libération des « **neutrophil extracellular traps** » (NETs). Ces NETs sont formés par des brins d'ADN (chromatine) décondensés décorés par des histones H2, H3 et H4 ainsi que des protéines granulaires telles que la MPO, l'élastase (protéase à sérine) et la MMP-9. Les NETs sont projetés en dehors du neutrophile et le processus de nétose évoque une forme particulière de mort cellulaire du neutrophile différente de la nécrose ou de l'apoptose [49]. Cette nétose est caractérisée par une décondensation de la chromatine suivie d'une rupture de l'enveloppe nucléaire puis cytoplasmique. Bien que des études montrent, qu'après la formation de NETs, les neutrophiles sont encore fonctionnels [50], leur survie reste un sujet débattu. La formation des NETs est induite après exposition aux micro-organismes, aux plaquettes activées ou encore aux cytokines pro-inflammatoires [48,51]. Les NETs possèdent des **propriétés antibactériennes** qui permettent de piéger les bactéries et éviter ainsi leur dissémination dans l'organisme [52,53] mais ils sont aussi à l'origine de dégâts tissulaires [54] et contribuent à l'initiation et au développement de la thrombose dans un contexte inflammatoire, ce phénomène est appelé **immuno-thrombose** [26,55] (*Figure 9*).



**Figure 9 : Intervention des monocytes et des neutrophiles dans l'immuno-thrombose**

[26].



Ce processus correspond à la **formation locale de thrombi** dans des micro-vaisseaux supportée par la génération de fibrine, le recrutement de cellules immunitaires (monocytes et neutrophiles) et de plaquettes. En raison de leurs surfaces chargées négativement, les NETs peuvent activer directement le FXII et donc la voie intrinsèque de la coagulation. Ils peuvent également lier le vWF et ainsi favoriser le recrutement des plaquettes. L'élastase, présente à la surface des NETs, a la capacité de cliver et d'oxyder le TFPI, cette inactivation favorise donc la coagulation. Les NETs activent également la voie extrinsèque de la coagulation en liant le FT [26]. Les histones extracellulaires portés par les NETs induisent l'activation plaquettaire *via* les récepteurs Toll-like (TLR2 et TLR4) [56]. La liaison de la prothrombine sur l'histone H4 va entraîner son auto-activation et la génération de thrombine [57]. Au cours de la thrombose, les NETs participent également à la structuration du caillot formant un véritable réseau qui permettrait son organisation notamment dans les thrombi riches en globule rouge [55].

## 2. Les monocytes

Les **monocytes** représentent 5% de la population leucocytaire. Ils ont une demi-vie courte comprise entre 36 et 104 heures [58]. Lorsqu'ils sont recrutés au cours de l'inflammation leur demi-vie est fortement augmentée. Ils ont la capacité de migrer dans les tissus où ils se différencient en macrophages. Les monocytes ont un rôle bien connu dans **l'inflammation**. En effet, ils s'accumulent au site inflammatoire et produisent des cytokines inflammatoires qui contribuent à l'inflammation locale et systémique [8]. Dans des conditions physiologiques, les monocytes circulants expriment à leur surface des molécules qui ont des fonctions anticoagulantes telles que le récepteur endothélial à la protéine C (EPCR), la thrombomoduline ou le TFPI. Mais après activation (conditions pathologiques), le phénotype des monocytes devient **pro-coagulant** et en particulier, les monocytes sont les seules cellules du sang à synthétiser et exprimer le FT, acteur majeur de la voie extrinsèque de la cascade de la coagulation [59,60].

Le **FT** (CD 142) est une glycoprotéine transmembranaire de 47 kDa. C'est un récepteur de haute affinité pour le FVII [61]. Le FT est composé d'une région extracellulaire de 219 acides aminés (aa), d'une région transmembranaire hydrophobe et d'une courte queue intracellulaire de 21 aa. La partie externe est constituée de 2 domaines de type III de la fibronectine (Fn), chacune possédant une liaison disulfure extracellulaire Cys49-Cys57 (N

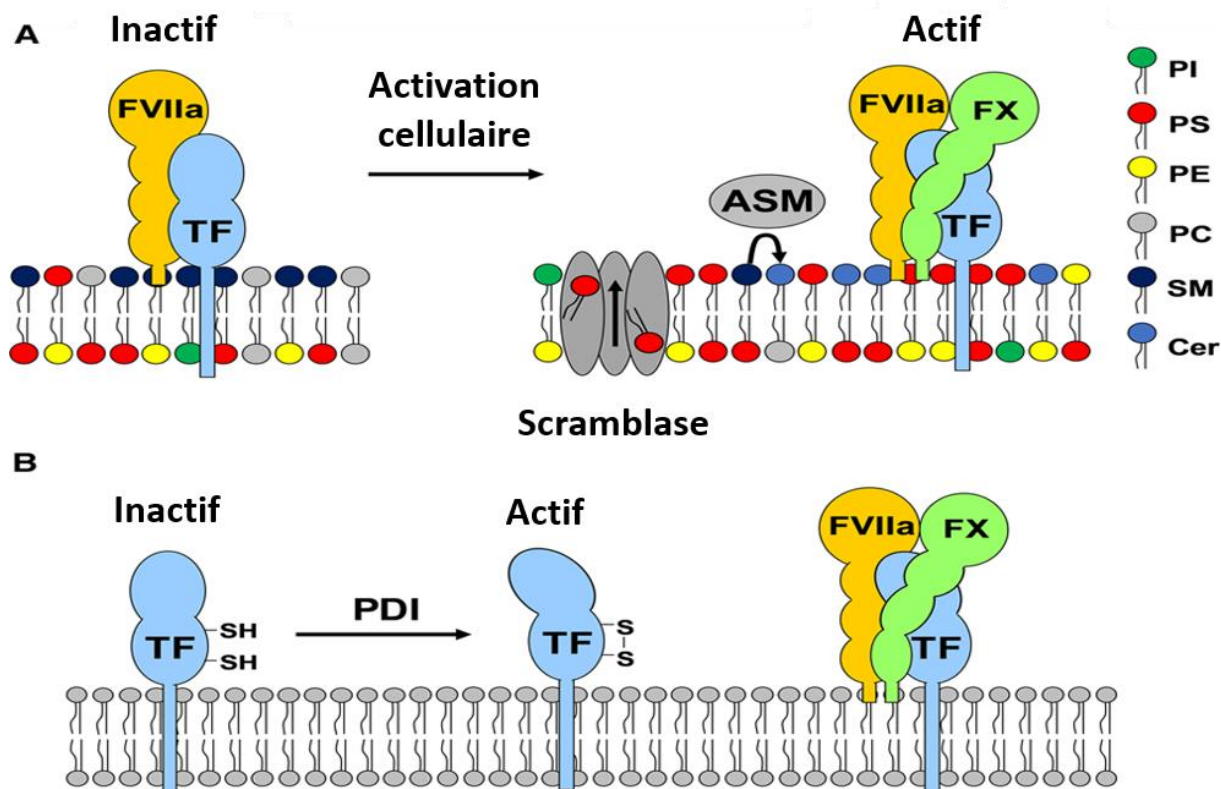
terminal) et Cys186-Cys209 (C terminal). Le FT est exprimé de façon constitutive par des cellules qui ne sont pas normalement en contact avec le sang comme les fibroblastes adventitiels, les péricytes ou encore les kératinocytes au niveau de la peau [7]. La topographie de cette répartition constitue une « enveloppe hémostatique » protectrice prête à induire la coagulation en cas de brèche vasculaire, assurant une protection pour les organes vitaux comme le cœur, les poumons et le cerveau. Dans des conditions normales, le FT n'est pas exprimé par les cellules sanguines circulantes [62]. En revanche, *in vitro*, après exposition à l'endotoxine bactérienne (LPS) par exemple, les monocytes expriment rapidement et de façon transitoire du FT. *In vivo*, l'expression de FT par les monocytes est responsable de la coagulation intra-vasculaire disséminée observée au cours du sepsis [7]. Cette induction de FT est dépendante de l'activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B (« Nuclear Factor-kappa B ») [63]. L'expression de FT par les plaquettes, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles est très controversée (**Tableau 1**). Certaines équipes proposent que le FT exprimé à la surface des monocytes après activation pourrait être libéré sous forme de **micro-vésicules** (donc riches en FT) qui seraient captées par les plaquettes activées, les neutrophiles et les cellules endothéliales [64–66]. En ce qui concerne l'expression du FT par les polynucléaires, elle a été retrouvée de façon convaincante pour 3 espèces : le singe, le lapin et la souris [67,68] mais pas pour l'homme. L'expression du FT par les cellules endothéliales existe *in vitro* mais est beaucoup plus difficile à démontrer *in vivo*. Les cellules endothéliales en culture (*in vitro*) expriment du FT en réponse à différents agonistes et cette induction est dépendante de la voie NF- $\kappa$ B [69]. *In vivo*, l'expression du FT par les cellules endothéliales a été retrouvée au niveau de la micro-circulation de la rate, des ramifications artérielles dans un modèle de choc septique chez le babouin et dans les poumons de souris drépanocytaires [62,70].

Type cellulaire	Expression du Facteur Tissulaire	In Vitro	In Vivo
Monocyte	Oui	37	39,40
Endothélium	Oui	41	40
Plaquette	Oui	42-46	47,48
	Non	49-51	-
Neutrophile	Oui	52	53
	Non	54	-
Eosinophile	Oui	55,56	-
	Non	57	-
Cellule T	Oui	58	58

***Tableau 1 : Expression du facteur tissulaire in vivo et in vitro par les différents types cellulaires (Adapté de Grover S.P. and Mackman N., 2018) [7].***

Tout comme les neutrophiles, **les monocytes contribuent à l’initiation et au développement de la thrombose dans le contexte inflammatoire de l’immuno-thrombose** [26,55] (**Figure 9**). En effet, les monocytes activés et leurs microvésicules qui expriment du FT se retrouvent au niveau des foyers infectieux où ils initient la voie extrinsèque de la coagulation et donc le développement du thrombus [71]. La détection de motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMPs), tel que le lipopolysaccharide (LPS), par des récepteurs exprimés par les monocytes (TLR et CD14), entraîne une transcription accrue du gène codant pour le FT et mène donc à l’expression de la protéine [72]. De plus, l’activité du FT est décuplée par la présence de motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs) tels que la phosphatidylsérine (PS) exposée à la surface des cellules activées ou endommagées [73].

Une étude récente a révélé qu’environ 1,5% des monocytes exprimaient des faibles taux de FT intracellulaire [74] ou inactif dans la membrane [75]. Le passage de **l’état inactif à l’état actif** du FT est fortement discuté et plusieurs mécanismes ont été proposés et rapportés par Grover S.P. and Mackman N. (**Figure 10**) [23].



**Figure 10 : Mécanismes d'activation du facteur tissulaire :** A) dépendant de l'environnement phospholipidique et B) dépendant des réactions d'oxydo-réduction des cystéines. PI : phosphatidyl inositol, PS : phosphatidyl sérine, PE : phosphatidyl éthanolamine, PC : phosphatidyl choline, SM : sphingomyéline, Cer : Céramide, PDI : protéine disulfure isomérase (Adapté de Grover S.P. and Mackman N., 2018) [7].

Classiquement, il a été proposé que l'activation/inactivation du FT dépendait de **l'environnement phospholipidique** (Figure 10 A) [76]. La membrane cellulaire est composée de 80% de phospholipides qui présentent une asymétrie de distribution. Au niveau du feuillet externe, on retrouve la sphingomyéline (SM) et la phosphatidyl choline (PC) (chargées positivement). Au niveau du feuillet interne, on retrouve la phosphatidyl sérine (PS) et la phosphatidyl éthanolamine (chargées négativement). Dans des conditions de repos, le FT est situé sur une membrane non coagulante qui présente une composition membranaire asymétrique avec des charges négatives séquestrées dans le cytoplasme. Cette asymétrie est maintenue grâce à une activité flippase ATP dépendante. Lors de l'activation cellulaire, l'activité d'une scramblase et d'une floppase permet l'externalisation de la PS : les PS présents dans le feuillet interne de la membrane vont être transportés et exposés au niveau

du feuillet externe par des mécanismes de « flip flop ». **L'exposition de la PS** chargée négativement accélère les réactions de coagulation sur les surfaces membranaires. Par exemple, à la surface plaquettaire, l'exposition de PS permet l'assemblage des complexes Ténase et Prothrombinase [77,78]. Pour les monocytes, l'activité du complexe FT-FVIIa semble être favorisée par la présence de PS [79]. Pour appuyer cette hypothèse, les cellules apoptotiques présentent une activité pro-coagulante plus importante du FT [80]. Il a également été mis en évidence que, contrairement aux surfaces lipidiques riches en PS, les surfaces lipidiques riche en PC entraînent une activité pro-coagulante du FT relativement limitée ce qui suggère que la PC maintient le FT dans un état moins actif [81,82].

Un deuxième modèle d'activation du FT suggère que l'activité pro-coagulante dépendante du FT est attribuable aux **réactions d'oxydo-réduction** de la liaison **Cys186-Cys209** situé sur sa partie C terminale (*Figure 10 B*). Le FT est maintenu à la surface de la cellule dans un état inactif par réduction dépendante de la protéine disulfure isomérase (PDI) et / ou de l'oxyde nitrique (NO). L'oxydation de la liaison disulfure entraîne la fonction coagulante du FT. Une étude a montré que l'activité pro-coagulante du FT était réduite d'environ 3 fois lorsque la Cys186 ou la Cys209 étaient mutées, alors qu'il n'y avait aucun effet sur la mutation des résidus Cys49 ou Cys57 (N terminal) [82,83]. Ces résultats suggèrent que la formation de la liaison disulfure Cys186-Cys209 est importante pour l'activité pro-coagulante du FT [83,84]. D'autres études ont montré que l'activation du FT des monocytes ou des microvésicules était favorisée par la sécrétion de PDI par les plaquettes activées, les cellules endothéliales activées ou les cellules endommagées. Cette sécrétion de PDI participe également à la génération de thrombine dépendante du FT dans différents modèles de thrombose artérielle [85,86].

Les monocytes activés, en exprimant du FT, jouent un rôle important dans le développement de la thrombose. Comme les neutrophiles, les monocytes possèdent des **récepteurs d'activation**. Par exemple, ils possèdent des récepteurs pour les produits du complément tels que les anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a) produites lors de l'activation du complément [40,87]. Ils possèdent également des récepteurs pour des médiateurs pro-inflammatoires tels que les TLRs, CD40, CD30 ou encore des récepteurs pour le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Ces récepteurs vont interagir avec diverses molécules tels que le LPS, les motifs moléculaires associés aux dégâts cellulaires (DAMPs), les motifs moléculaires associés à des agents pathogènes (PAMPs), le TNF- $\alpha$  ... et activer les monocytes. Par exemple, la stimulation

de récepteurs comme TLRs, TNF-RI ou encore CD40 entraîne une signalisation intracellulaire via la voie NF- $\kappa$ B permettant ainsi la transcription du gène qui code pour le FT.

**La thrombose est donc une déviation pathologique de l'hémostase responsable de la formation d'un thrombus. Si cette thrombose se développe dans un contexte inflammatoire, on parle alors d'immuno-thrombose qui :**

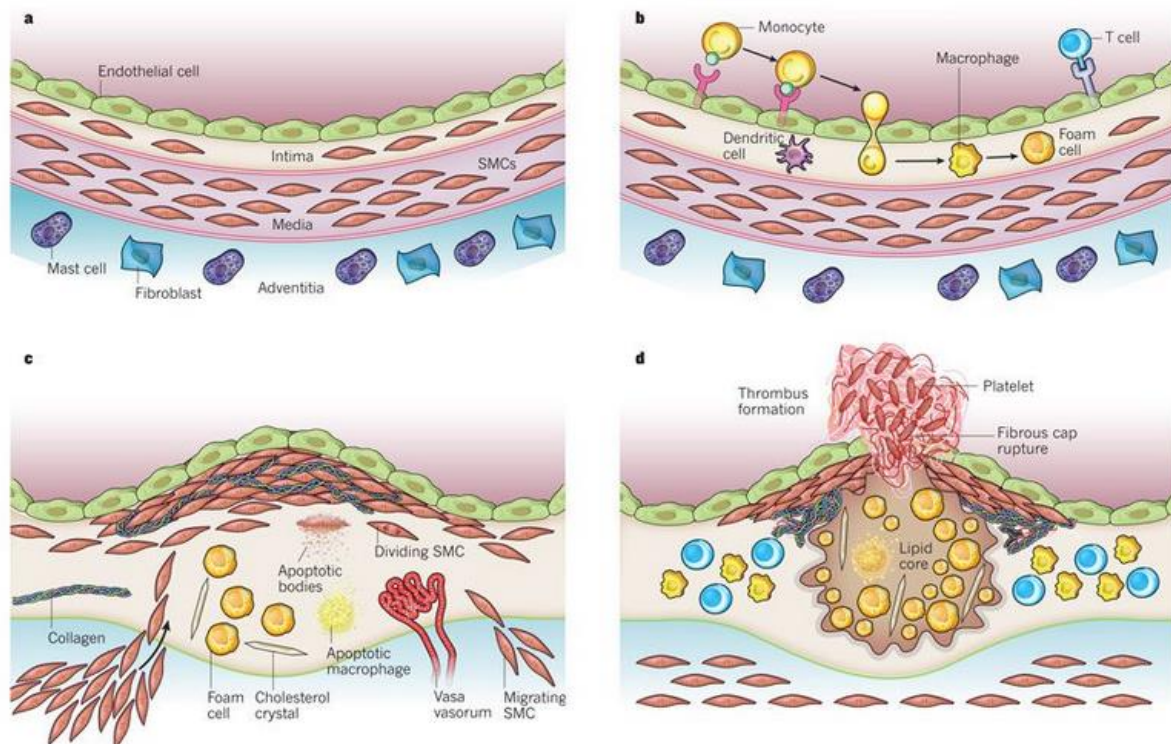
- i) Implique un recrutement de monocytes et de neutrophiles au cours de la formation du thrombus**
- ii) Joue un rôle important dans l'intégration d'un biomatériau**
- iii) Peut aboutir à une activation excessive et incontrôlée de l'inflammation et de la coagulation ce qui peut être préjudiciable pour l'hôte et pour le biomatériau implanté.**

**Il est donc important de comprendre ces processus physiologique (hémostase) et pathologiques (thrombose) afin de mieux appréhender les phénomènes liés à l'implantation de biomatériaux en contact avec le sang.**

## **II. Les biomatériaux vasculaires pour des applications de contact avec le sang**

Les **maladies cardiovasculaires** sont l'une des premières causes de mortalité dans le monde. Selon l'OMS, chaque année, 17,7 millions des décès seraient liés à ces maladies soit 31% de la mortalité mondiale. Les maladies cardiovasculaires englobent une multitude de maladies affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Certaines d'entre elles conduisent à la formation d'un thrombus observé dans l'infarctus du myocarde, l'accident vasculaire cérébral ou la thrombose veineuse. Une autre maladie de la paroi artérielle pouvant conduire à la formation d'un thrombus est l'athérosclérose. **L'athérosclérose** est un processus pathologique chronique et multifactoriel de la paroi artérielle. Ce processus, lent et complexe, désigne la perte d'élasticité des artères due à la sclérose, elle-même provoquée par l'accumulation de corps gras sur la paroi interne des artères. Ce dépôt dû à l'accumulation de lipides amorphes (triglycérides, cholestérols) et de nombreux éléments sanguins dans l'espace sous endothélial conduit ainsi à la formation d'une plaque d'athérome (*Figure 11*). Cette plaque peut engendrer un simple

rétrécissement de la lumière artérielle (**sténose**) ou l'obstruction du vaisseau (**thrombose**). Cette maladie affecte principalement les artères du cœur, du cerveau et des membres inférieurs.



**Figure 11** : Différentes étapes du développement de l'athérosclérose [88]

Actuellement, plusieurs traitements sont disponibles pour empêcher la progression de cette maladie. Dans certains cas, un traitement médicamenteux (statines) visant à diminuer les lipides circulants et un contrôle de l'alimentation peuvent être suffisants. Cependant, si une obstruction trop sévère de l'artère est avérée, une intervention chirurgicale est nécessaire. Elle peut être réalisée par des techniques endovasculaires telle qu'une **angioplastie** suivie d'une pose de stent (endoprothèse vasculaire) ou par une méthode chirurgicale conventionnelle telle qu'un **pontage coronarien**.

La pose de **stent** est une intervention très fréquente. A titre d'exemple, chaque minute, 3 stents sont posés en Europe (*selon le professeur Jean-Jacques Goy*). Ces chiffres révèlent donc l'importance et la nécessité de mettre au point des dispositifs de suppléance dans le domaine cardiovasculaire avec une demande qui croît de jour en jour. Ces biomatériaux, développés dans le but de rétablir une circulation sanguine (stent, substitut vasculaire ...) ou



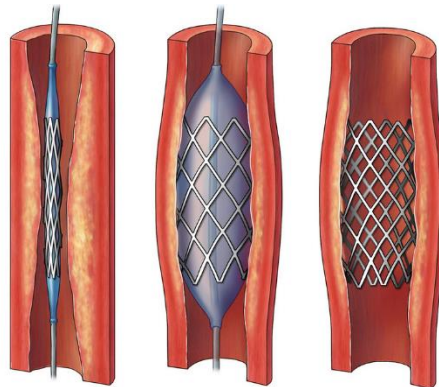
pallier à une déficience du système cardiaque (valve, pacemaker ...), se doivent d'être optimisés pour répondre de manière appropriée dans le corps. Le succès de ces biomatériaux dépend de leur biocompatibilité. Deux considérations sont donc à prendre en compte lorsqu'on s'intéresse aux biomatériaux en contact avec le sang :

- i) **Les propriétés physiques et mécaniques** telles que la résistance à l'usure, à la déchirure et à la corrosion [89,90].
- ii) **Les propriétés biologiques**, autrement dit, la **biocompatibilité du matériau** avec son environnement. En effet, l'implant ne doit pas entraîner d'inflammation, de toxicité, d'action mutagène ou cancérogène. Il est également impératif qu'il soit non-thrombogène, non calcifiant, non immunogène et qu'il permette la cicatrisation (endothélialisation) [91].

## A. Les dispositifs implantables

### 1. Les endoprothèses vasculaires

L'**angioplastie** est une technique qui permet de rétablir le diamètre de l'artère obstruée, permettant ainsi une re-canalisation du vaisseau. Cette technique consiste à écraser, à l'aide d'un ballonnet gonflable, les plaques d'athérome formées sur la paroi de l'artère. Généralement, l'angioplastie est complétée par la pose d'un stent, sorte de petit tube grillagé métallique expansible (ressort) monté sur le ballonnet. Une fois le ballonnet gonflé, le stent se déploie et permet de maintenir l'artère ouverte (**Figure 12**).



**Figure 12** : Angioplastie coronarienne avec pose de stent



La majorité des stents sont constitués d'une **structure métallique**. En effet, les métaux couramment utilisés dans la fabrication des stents présentent de nombreux avantages : ils résistent aux chocs, à l'usure, à la corrosion et ont une ductilité et une capacité à absorber une énergie de déformation élevée [91,92]. Ils permettent également d'exercer une force radiale suffisante pour s'opposer au retour élastique de l'artère traitée. Ces propriétés font donc des métaux des candidats appropriés pour les endoprothèses vasculaires.

Il existe de nombreux types de **métaux et alliages** mais pour les matériaux cardiovasculaires on retrouve principalement : l'acier inoxydable 316L [93], les alliages à base de Cobalt (CoCr) [94] ainsi que le titane et ses alliages [95]. Le choix pour un implant dépend en grande partie de son application médicale. Le titane et l'acier inoxydable ont été classiquement utilisés dans la conception des endoprothèses vasculaires mais, plus récemment, l'utilisation du CoCr ou d'alliage de platine est de plus en plus fréquente de par leurs propriétés mécaniques plus appropriées [96,97]. L'alliage **CoCr L-605** possède un module de Young élevé qui permet de réaliser des mailles très fines, ce qui en fait donc un bon candidat pour les stents coronariens. Des études ont montré que l'épaisseur des mailles ainsi que leur géométrie avaient un rôle dans les phénomènes de resténose et de thrombose [98,99]. L'utilisation du CoCr a permis, grâce à la réduction de l'épaisseur des mailles, de diminuer le taux de resténose d'environ 15 % [98]. De plus, le CoCr est radio-opaque et non ferreux et n'interfère donc pas avec l'IRM. Actuellement 17 % des stents autorisés par la FDA sont en CoCr [100].

Les stents sont généralement classés en 3 types basés sur leurs fonctions et leurs caractères physiques : i) les stents en métal nu, ii) les stents à élution de médicaments et iii) les stents biodégradables/résorbables.

#### a. Les stents en métal nu

Les **stents en métal nu** ont été les premiers stents à avoir été utilisés et sont constitués d'une plateforme en métal organisée en maillage. La première implantation de stent intracoronarien chez l'homme a été réalisée en 1986. Le stent était alors composé d'acier inoxydable [101]. Cependant, les taux de **resténose et de thrombose** étaient importants et nécessitaient un traitement anti-plaquettaire à long terme [102].

### **b. Les stents à élution de médicaments**

Ces difficultés ont conduit au développement des **stents à élution de médicaments**. Ces nouveaux types de stents sont majoritairement constitués d'une structure métallique recouverte de **polymère** qui joue un rôle de réservoir pour la libération contrôlée de molécules thérapeutiques au cours du temps. Ce dispositif a pour but de diminuer les complications observées avec les stents en métal nu en diminuant la resténose *via* l'inhibant de la croissance néo-intimale (prolifération des cellules vasculaires musculaires lisses). Cependant, des difficultés importantes sont apparues avec l'utilisation de ces stents à élution de médicaments en termes de **thrombose précoce et tardive** et en termes de **biocompatibilité médiocre** des revêtements en polymère [91,103]. En effet, les polymères utilisés, tels que le copolymère de styrène translucide d'isoprène butadiène (SIBS) ou l'acide polylactique co-glycolique (PLGA) pour le relargage des médicaments peuvent provoquer un dysfonctionnement endothélial et une inflammation chronique au site de l'implantation [91]. De plus, les médicaments utilisés ont le plus souvent une action anti-proliférative et vont donc retarder le processus de ré-endothélialisation des endoprothèses [104]. Ces résultats suggèrent la nécessité de développer des polymères ayant une meilleure biocompatibilité. Bien que des études aient montré que les stents à élution de médicaments permettaient de réduire la resténose [105,106], des travaux récents menés sur 253 thrombus de stent montrent que dans 31,2% des cas les stents implantés étaient des stents en métal nu et dans 65,5% des stents à élution de médicaments [107]. Ces constatations peuvent s'expliquer par l'effet cytotoxique des médicaments contenus dans les stents à élutions de médicaments qui ont un impact sur les leucocytes, les cellules vasculaires musculaires lisses et les cellules endothéliales et donc sur la cicatrisation du vaisseau [108].

### **c. Les stents biodégradables/résorbables**

Les **stents biodégradables/résorbables** ont un rôle de support mécanique temporaire en se dégradant pour permettre le remodelage des tissus [109]. Le stent semble être nécessaire dans l'organisme pour une durée de 6 à 12 mois au cours de laquelle le remodelage et la cicatrisation artérielle ont lieu. Après cette période, le stent n'a plus d'effet bénéfique. Des stents à base de magnésium [110,111] ont donc été conçus pour se dégrader progressivement par corrosion au contact des fluides corporels [111]. Cependant, ces dispositifs résorbables

présentent des inconvénients. En effet, la **dégradation non contrôlée et non uniforme** peut conduire à une défaillance structurale prématurée. De plus, les propriétés mécaniques des principaux matériaux utilisés pour la conception des stents biodégradables/biorésorbables sont relativement éloignées du matériau de référence qu'est l'acier inoxydable 316L. Pour obtenir une même force radiale, les stents biodégradables/résorbables ont besoin d'avoir des mailles plus épaisses, paramètre pouvant influencer sur le taux de resténose [98,99]. Les propriétés mécaniques évoluent au cours de la dégradation du stent et donc la force radiale diminue.

**Les mécanismes qui aboutissent à la resténose et à la thrombose après l'implantation de stents sont encore mal définis mais selon les études cliniques il semble que différentes causes en soient à l'origine :**

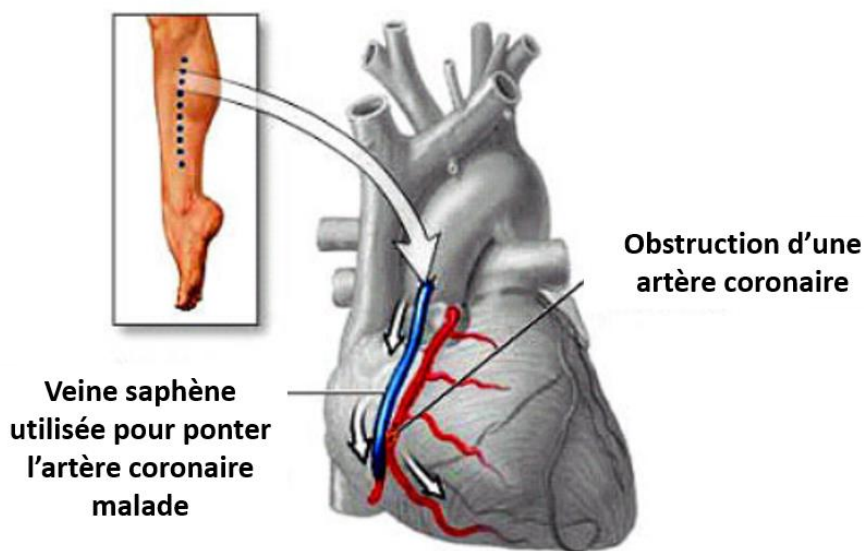
- **Un arrêt prématuré des traitements antiagrégants plaquettaires [112,113]**
- **Un retard de réendothélialisation du stent ou un dysfonctionnement des cellules endothéliales [114,115]**
- **Une réaction au polymère de revêtement [116] causé par une biocompatibilité insuffisante**
- **Un défaut de positionnement du stent laissant les mailles non plaquées contre la paroi vasculaire et donc perturbant le flux sanguin [117,118]**

**L'élaboration de stents présentant toutes les qualités requises pour une bonne implantation, en évitant la resténose, la thrombose et en favorisant le remodelage de l'artère reste donc actuellement un défi.**

## **2. Les substituts vasculaires**

L'angioplastie n'étant pas toujours possible, un **pontage vasculaire** (dérivation) peut être réalisé (*Figure 13*). Cette technique consiste à contourner la zone obstruée d'un vaisseau. Cette chirurgie, plus lourde que l'angioplastie, est utilisée dans le cas où plusieurs zones rétrécies sont constatées ou si le rétrécissement est situé au niveau d'une bifurcation par exemple. Cette technique est également utilisée lorsque le patient souffre d'une angine de poitrine ou qu'il y a un risque d'infarctus. Le choix du type de greffon repose principalement sur le diamètre et le débit du vaisseau obstrué. Les greffons utilisés peuvent être d'origines

variées : des vaisseaux natifs, des vaisseaux synthétiques et des vaisseaux reconstruits par ingénierie tissulaire.



**Figure 13 :** Représentation d'un pontage vasculaire grâce à l'utilisation d'une veine saphène

#### a. Les vaisseaux natifs

Les **tissus autologues**, c'est-à-dire provenant du patient lui-même, sont les matériaux de choix pour les greffes vasculaires. En effet, ils présentent toutes les propriétés mécaniques et biologiques nécessaires au bon fonctionnement du vaisseau. Ils permettent également de diminuer les risques immunogènes et les réactions inflammatoires en présence d'un corps étranger. Les vaisseaux autologues les plus utilisés sont principalement l'artère mammaire interne, l'artère radiale (avant-bras) et la veine saphène (jambe) [119]. Cependant, l'utilisation d'une veine pour remplacer une artère nécessite, avant greffage, la destruction des valvules. La greffe de tissus autologues veineux présente un taux de réussite après un an de l'ordre de 80 à 90%. Ce succès est attribuable notamment à leur stabilité dans le temps, leur perméabilité et leur facilité d'emploi. Cependant, des occlusions après pontage sont parfois constatées, principalement dues à une hyperplasie néo-intimale au niveau du site de l'anastomose ou au greffon qui peut être abimé lors du prélèvement ou pendant les manipulations pré-opératoires (la destruction des valvules). L'utilisation d'artères autologues, quant à elle, présente des propriétés mécaniques (paroi artérielle) et biochimiques (l'endothélium) supérieures mais son

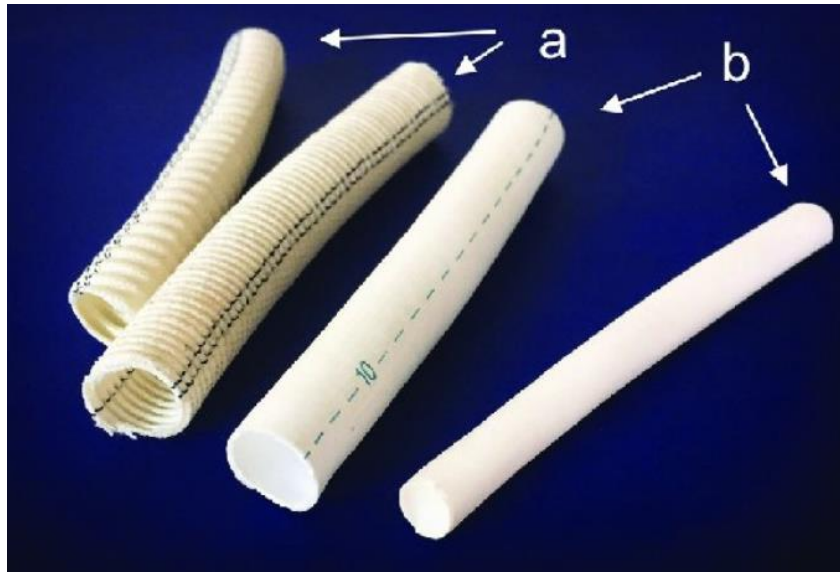
utilisation est limitée en raison de leur faible disponibilité et/ou de l'état pathologique des vaisseaux qui peuvent être sujet à la formation d'athérome.

Une alternative consiste à utiliser des **greffes allogéniques** (donneur de la même espèce) ou **xénogéniques** (espèces différentes). Les greffes allogéniques semblent être le bon compromis lorsqu'il n'est pas possible de prélever le patient lui-même. Cependant, le corps peut considérer ce vaisseau comme un corps étranger, déclenchant alors une réaction immunitaire et provoquant le rejet de la greffe malgré la prise de médicaments immunosuppresseurs. Les greffes xénogéniques proviennent de porcs, vaches ou encore de chevaux. Elles possèdent également de bonnes propriétés mécaniques mais sont susceptibles de déclencher une réponse immunitaire même avec la prise de médicaments immunosuppresseurs ou après décellularisation du vaisseau. Elles peuvent également transmettre des maladies telles que la maladie du prion. Le nombre et la qualité des vaisseaux disponibles restent donc limités. C'est pourquoi la recherche se concentre à trouver des solutions alternatives permettant de mettre au point des prothèses adaptées permettant de restaurer la fonction tout en limitant la réponse immunitaire responsable du rejet de la greffe.

### b. Les vaisseaux synthétiques

Les biomatériaux utilisés pour élaborer des **vaisseaux synthétiques** sont généralement des **polymères** car les propriétés de ces matériaux peuvent être facilement adaptables. On retrouve, par exemple, l'utilisation d'acide polylactique (PLA), d'acide polyglycolique (PGA), d'acide poly(lactidoglycolique) (PLGA) ou de polyuréthane (PU) [120]. Actuellement, le **polytétrafluoroéthylène expansé** (ePTFE) et le **polyéthylène téréphtalate** (PET), connus respectivement sous le nom de Goretex® et Dacron®, sont deux matériaux synthétiques non dégradables utilisés en clinique (**Figure 14**). Ils sont utilisés pour des applications de greffes vasculaires de grand diamètre (supérieur à 6 mm). La composition chimique du ePTFE a permis de limiter la thrombogénicité, le taux de resténose et le taux de calcification [121,122], ainsi que la réaction allergique et l'inflammation [123]. De son côté, le PET favorise l'endothélialisation sans calcification ni prolifération tissulaire [124]. Cependant, le Goretex® et le Dacron® présentent l'inconvénient d'être des matériaux synthétiques et peuvent donc provoquer une réaction de corps étranger avec un **risque de thrombose**. Mais surtout, ils ont échoué pour des greffes vasculaires de diamètres inférieurs à 6 mm, notamment dans le cas du remplacement de

l'artère coronaire, en raison de complications comme la thrombose ou l'hyperplasie de l'intima au niveau de l'anastomose [120,125]. En effet, la diminution du débit et l'augmentation de la résistance provoquent une accumulation de facteurs pro-coagulants, entraînant une thrombose accrue [126]. De même, une sécrétion de matrice extracellulaire excessive après infiltration cellulaire de l'intima, ressemblant à une cicatrisation hypertrophique, entraîne une hyperplasie intimale donc une nouvelle obstruction de l'artère.

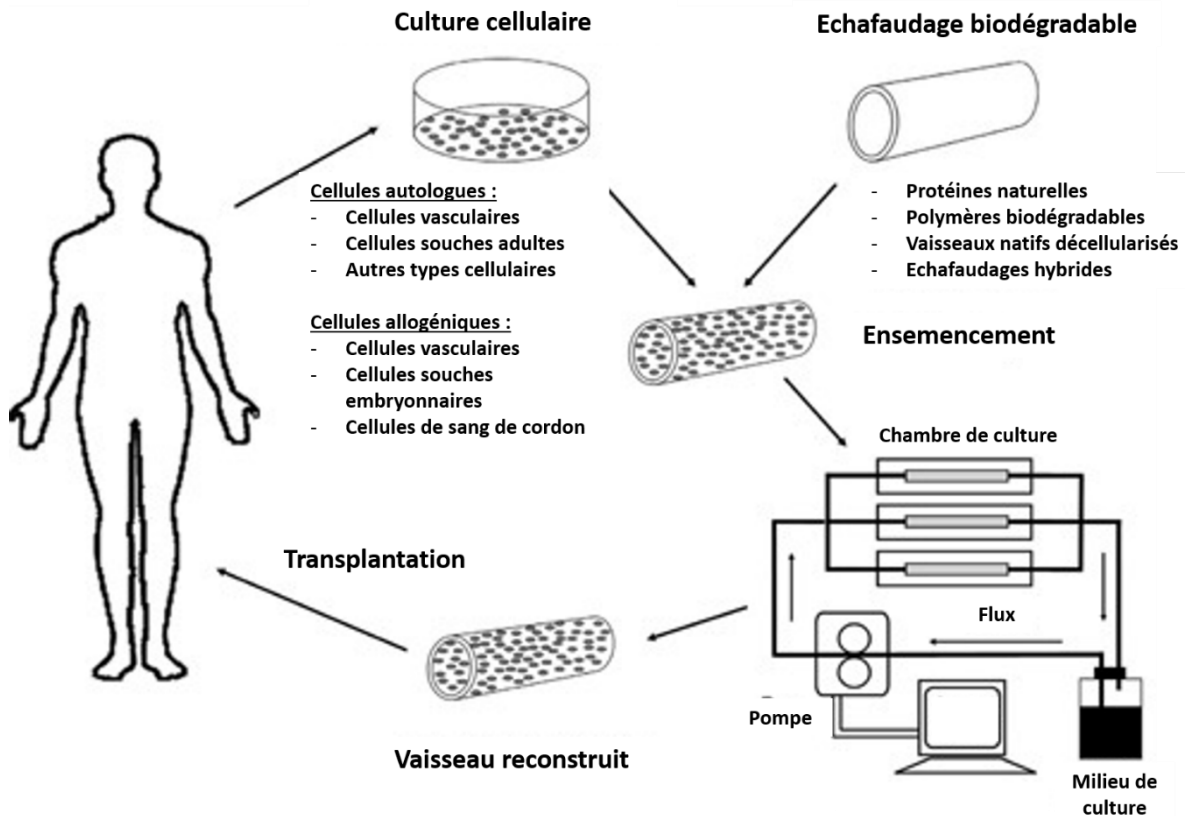


**Figure 14** : *Substituts vasculaires synthétiques* : a) Polyéthylène téréphtalate (PET) aussi appelé Dacron® et b) Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) aussi appelé Goretex® [127].

### c. Les vaisseaux reconstruits par l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire a pour objectif de fabriquer des **tissus biologiques à partir de cellules et de biomatériaux** pour l'implantation chez le patient [128]. L'idée est de mimer l'intima afin de réduire l'adhésion des plaquettes et la thrombogenèse et ainsi accroître la perméabilité du greffon. Le biomatériau doit donc provoquer la même réponse hémostatique qu'un vaisseau naturel et maintenir une homéostasie normale. Les propriétés mécaniques du greffon doivent également être contrôlées et semblables à la média. La **Figure 15** illustre cette procédure. Des cellules du patient vont être prélevées et mises en culture. Parallèlement, un biomatériau polymère poreux est synthétisé. Les cellules sont ensuiteensemencées sur le

biomatériau. Avant implantation, une étape de maturation dans un bioréacteur est nécessaire afin d'améliorer les propriétés mécaniques et de pouvoir tester le greffon dans différentes conditions physiologiques. Bien que très prometteuse, cette procédure nécessite du temps pour permettre la prolifération cellulaire. De plus, il est préférable d'utiliser des cellules autologues, ce qui peut s'avérer compliqué en cas d'urgence.



**Figure 15 : Reconstruction vasculaire par ingénierie tissulaire (Adapté de Zhang W.J. et al., 2007) [129]**

La greffe vasculaire idéale devrait présenter certaines caractéristiques essentielles telles que [130]:

- Une suture facile et robuste pour supporter la manipulation lors de l'opération
- Des propriétés mécaniques et hémodynamiques adaptées pour maintenir la perméabilité et l'intégrité des vaisseaux à court et à long terme
- Une non immunogénicité, non thrombogénicité et être non infectieux
- Une durabilité dans le temps

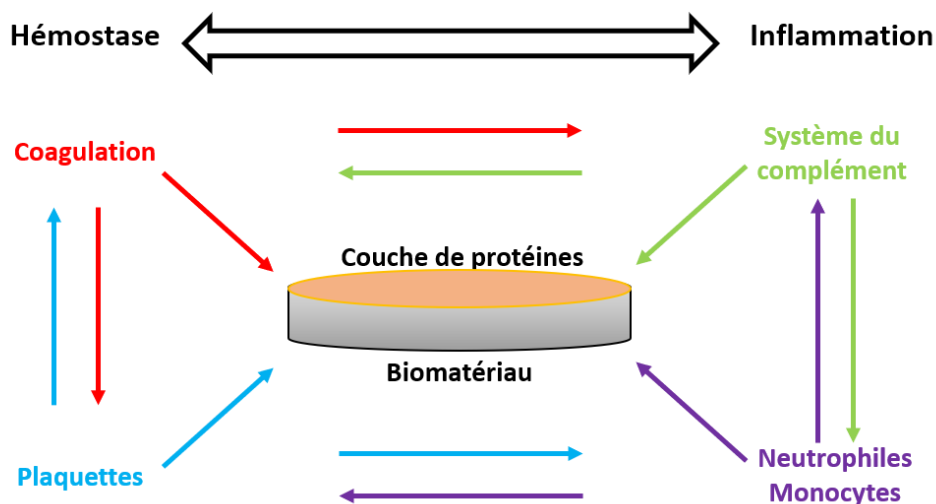
- Permettre un remodelage correct du tissu hôte en limitant l'hyperplasie néo-intimale
- Être vasoactive
- Être facilement disponible avec peu de préparation chirurgicale

Actuellement, le substitut vasculaire idéal avec de telles caractéristiques n'est pas disponible même si quelques matériaux réunissent plusieurs de ces critères.

## B. La réponse à l'implantation

L'interaction adéquate de la surface d'un biomatériau avec le vivant est d'une grande importance pour le succès d'un dispositif médical. La compréhension des phénomènes qui se produisent lors de l'interaction sang-biomatériau est essentielle pour améliorer les performances de l'implant.

Dans des conditions normales, le sang est en contact avec l'endothélium qui présente des propriétés anti-thrombotiques. La mise en place d'un dispositif cardiovasculaire représente l'introduction d'une **surface étrangère** qui ne possède pas les propriétés de l'endothélium et peut donc mener à la thrombose. Les interactions sang-biomatériau déclenchent une série d'événements complexes telles que **l'adsorption des protéines, l'adhésion/activation des plaquettes et des leucocytes, l'activation du complément et de la coagulation**. Tous ces événements sont étroitement liés comme le montre la *Figure 16*.



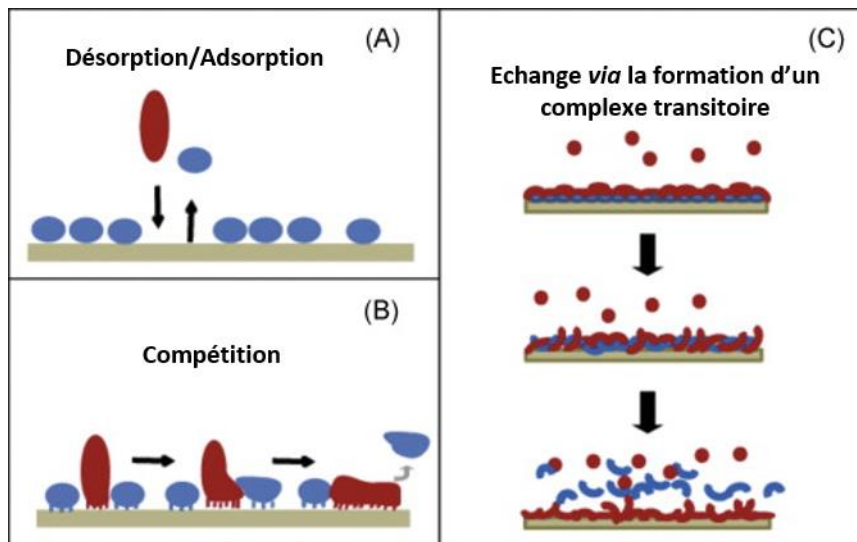
**Figure 16** : Divers processus impliqués dans l'interaction sang-biomatériau (Adapté de Gorbet M.B. et al., 2004 ) [6]



## 1. L'adsorption des protéines plasmatiques

L'un des premiers événements qui se produit lors de l'implantation d'un biomatériau est **l'adsorption des protéines plasmatiques**. En effet, après quelques secondes d'exposition aux fluides biologiques, les protéines commencent à s'adsorber à la surface du biomatériau. En résulte une « nouvelle » surface biologique qui influencera la réponse de l'hôte, notamment la cascade de coagulation ainsi que l'adhésion, l'activation et la prolifération des cellules. Les biomatériaux implantés sont soumis à l'effet « **Vroman** » [131,132] représenté en **Figure 17**.

Ce processus met en évidence la **dynamique d'interaction** de l'eau et des protéines avec la surface du biomatériau. Les protéines les plus abondantes s'adsorbent initialement à la surface, cependant, au fil du temps, elles sont remplacées par des protéines ayant des affinités de liaison plus forte. Les liaisons établies entre la surface et les protéines lors de l'adsorption sont des liaisons de faibles énergies pouvant être rompues et reformées. Les protéines interagissent différenciellement avec la surface du biomatériau en fonction de leurs propriétés physico-chimiques, **la couche de protéines est donc spécifique d'un biomatériau et contribue à l'activité de la surface**.



**Figure 17** : Effet Vroman : A) Adsorption/désorption de protéines. B) Compétition entre protéines. C) Echange via la formation d'un complexe transitoire de deux protéines : la protéine 1 (bleue) initialement adsorbée est recouverte de protéine 2 (rouge), la protéine 1 se désorbe et la protéine 2 reste à la surface (Adapté de Hirsh S.L. et al., 2013) [133]

Les protéines sont en compétition pour s'adsorber sur la surface et cette adsorption est influencée par divers paramètres tels que la **concentration en protéines, la vitesse de diffusion et l'affinité**. La vitesse de diffusion est principalement influencée par la taille de la protéine. En effet, plus la protéine est petite et plus sa diffusion est rapide et elle s'adsorbera donc en premier à la surface. Cependant, les petites protéines ont moins de points de contacts potentiels avec la surface ce qui joue également un rôle sur leur affinité. La probabilité que la protéine s'adsorbe sur la surface et y reste est donc liée à son affinité pour cette surface [134]. La couche de protéine dynamique évolue donc au cours du temps à la surface du matériau [134].

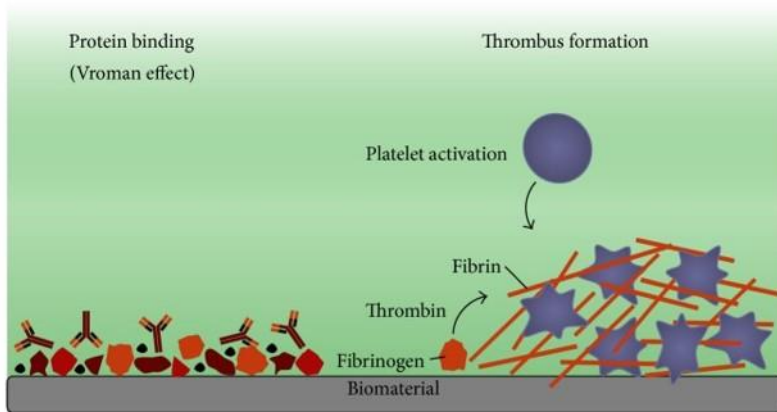
Tous ces paramètres sont dépendants et étroitement liés aux propriétés de la protéine tels que **son hydrophobie, sa taille, sa charge et sa stabilité structurale** [135]. Les domaines polaires (hydrophiles) ont tendance à s'adsorber sur des surfaces polaires et inversement pour les surfaces hydrophobes. Les protéines moins stables structurellement vont se déployer plus facilement et donc former plus de points de contacts.

Les propriétés globales de surface d'un biomatériau telles que la **composition chimique avec des groupements fonctionnels, la topographie et la rugosité, l'hydrophobie et la charge de surface** influencent également l'adsorption, la structure et la fonction des protéines [2,3,136]. Les surfaces hydrophobes ont tendance à adsorber une quantité de protéines supérieure aux surfaces hydrophiles [137]. Ces constatations peuvent s'expliquer par le fait que les surfaces hydrophiles sont abondamment liées à des molécules d'eau ce qui réduit l'accessibilité de la surface pour les protéines, contrairement aux surface hydrophobes [138]. Les charges opposées entre la surface et les protéines favorisent une meilleure adsorption. La rugosité permet également d'influencer la quantité de protéines adsorbée et modifie leur distribution spatiale et leur conformation [139]. Les topographies à l'échelle nanométrique semblent influencer l'adsorption des protéines (dont la taille est du même ordre de grandeur), alors que les topographies à l'échelle micrométrique semblent lisses pour les protéines réduisant ainsi l'effet de la surface sur l'adsorption. Cependant, certaines études ont montré que, malgré tout, la topographie à l'échelle micrométrique pouvait influencer les interactions protéines-surface [139]. La composition chimique de surface favorise des types de liaison différentes entre surface et protéines [135]. A titre d'exemple, les surfaces hydrophobes non polaires composées de groupements -CH<sub>3</sub> lient fortement fibrinogène et l'IgG, et induisent *in vivo* un recrutement important de cellules inflammatoires à la surface du biomatériau. Les surfaces recouvertes de groupements -COOH (hydrophiles) interagissent préférentiellement avec la fibronectine (Fn) et l'albumine [140,141].

L'interaction des protéines plasmatiques avec des surfaces artificielles et plus particulièrement des surfaces chargées négativement telles que le verre, le collagène, la silice ou encore le sulfate de dextrane [32] déclenche **l'activation de la voie intrinsèque de la coagulation** par contact comme abordé en *section I.A.2.b*. Les propriétés de surface (composition chimique, hydrophobie, énergie de surface) influençant l'auto-activation du FXII ont été étudiées [142–144]. Des études montrent que l'activation de la voie intrinsèque par **l'auto-activation du FXII** est principalement observée sur des surfaces anioniques [145,146] ou hydrophiles [142]. Cependant, d'autres études démontrent que les surfaces hydrophobes et hydrophiles ont des propriétés d'auto-activation du FXII presque égales ce qui laisse penser que l'activation du FXII ne serait pas spécifique aux surfaces hydrophiles et anioniques [144,147]. D'un autre côté, des travaux se sont intéressés à cette voie intrinsèque lors de l'implantation d'un biomatériau. Ils ont montré que de faibles quantités de thrombine ou de complexe thrombine – antithrombine (TAT) ont été générées lorsque les biomatériaux étaient incubés avec du plasma non dilué seul [148,149]. De plus, les quantités de kallikréine et de facteur XII adsorbés sur les surfaces n'étaient pas corrélées avec la formation de complexe TAT [148] ce qui suggère que l'implication des seules protéines de la voie intrinsèque n'est pas suffisante pour expliquer l'activation de la coagulation au contact des biomatériaux. Une étude a, en effet, montré que **la présence de leucocytes était nécessaire à l'activation de la cascade de la coagulation par les biomatériaux** [149].

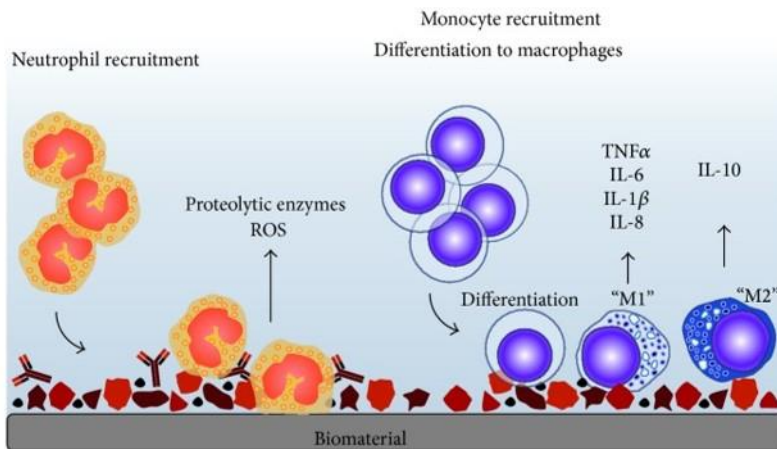
## 2. L'activation des cellules du sang

L'introduction d'un biomatériau, son utilisation et sa fonction peuvent être compromises par le développement d'un phénomène appelé **réaction à un corps étranger** (FBR, « *Foreign Body Reaction* »). Tous les biomatériaux sont soumis à cette réaction qui implique notamment les globules blancs, plus particulièrement les **neutrophiles, monocytes et macrophages**. La gravité et les manifestations cliniques de ce phénomène peuvent conduire à l'intégration du dispositif ou à l'échec de l'implantation. Dans le cas particulier des biomatériaux qui sont en contact direct avec le sang circulant, les protéines plasmatiques s'adsorbent à la surface de l'implant et forment une matrice provisoire qui peut être riche en facteurs pro-coagulants, créant ainsi une **surface thrombogène** (*Figure 18*). Cette surface est favorable à l'adhésion et à l'agrégation des plaquettes [150].



**Figure 18** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Adsorption de protéines et formation d'un thrombus [150].

Les **plaquettes** adhérentes peuvent alors recruter et activer les leucocytes du sang circulant, en particulier les neutrophiles et les monocytes, qui vont contribuer à la formation du thrombus en adhérant et en libérant des cytokines permettant le recrutement de nouvelles cellules inflammatoires (**Figure 19**) [151,152].



**Figure 19** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Recrutement des neutrophiles puis des monocytes sur le site d'implantation et différenciation des monocytes en macrophages [150].

Le **neutrophile** est l'une des premières cellules inflammatoires recrutées au site d'implantation [153]. La présence de neutrophiles activés au niveau de ce site peut être délétère. En effet, la libération d'enzymes protéolytiques, de formes réactives de l'oxygène (ROS) et le

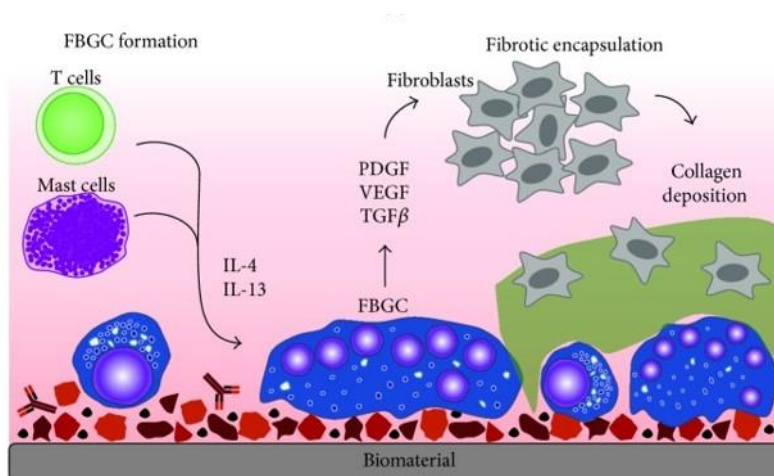
phénomène de nérose peuvent concourir à entraver le processus de guérison s'ils sont mal contrôlés [154,155]. Une étude a ainsi mis en évidence un retard de ré-épithélialisation dans le cas du diabète où la nérose était renforcée [156]. D'autre part, l'épuisement des neutrophiles pourrait accélérer la fermeture de la plaie chez les souris diabétiques [157]. Les phénomènes **d'adhésion et d'activation des neutrophiles** par le contact avec un biomatériau sont bien décrits *in vitro*. Ainsi, différentes études ont montré des changements dans l'expression des molécules d'adhésion (diminution des CD62L et augmentation de CD11b), une augmentation des cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$ , MCP1 et IL-8), le relargage de formes réactives de l'oxygène (ROS) ou encore la formation de NETs [15,158,159]. *In vivo*, un même profil d'activation a été décrit après implantation de stimulateurs cardiaques intrathoraciques [160]. Au site inflammatoire, les neutrophiles jouent un rôle important dans le **recrutement et l'activation des monocytes/macrophages** car ils sont capables de sécréter des cytokines inflammatoires comme l'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) et MIP-1 (Macrophage Inflammatory Protein-1) (**Figure 19**) [161]. Les macrophages recrutés sont capables de phagocyter les neutrophiles apoptotiques, non-apoptotiques, mais également la myéloperoxidase (MPO). Si dans le cas de la phagocytose de neutrophiles apoptotiques, le macrophage acquiert un phénotype anti-inflammatoire de « réparation », la phagocytose de la MPO par le macrophage lui confère un phénotype pro-inflammatoire. La sécrétion par le macrophage de cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  et de G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) va induire le recrutement de nouveaux neutrophiles, inhiber l'apoptose de ceux-ci et donc prolonger leur durée de vie [153].

Comme décrit précédemment, les **monocytes** sont capables de synthétiser et d'exprimer du FT en réponse à un stimulus. Cette propriété leur confère un rôle prépondérant dans le développement des thromboses après contact avec un biomatériau, le FT étant considéré comme l'initiateur majeur de la coagulation. *In vivo*, **l'activité et l'expression du FT** par les monocytes sont augmentées entre 2 et 6 heures de circulation extracorporelle expliquant l'activation de la coagulation observée dans cette situation [162]. *In vitro*, une induction d'expression du FT par les monocytes a été retrouvée après contact avec des billes de polystyrène [163]. Une induction du FT monocyttaire a également été étudiée après contact avec des greffons vasculaires résorbables et la quantité de FT induite est dépendante du diamètre des fibres du matériau utilisé [164]. La **chimie de surface** des biomatériaux influence la transcription et l'expression de FT mais aussi l'adhésion des monocytes, les surfaces des présentant des groupements -OH augmentant ces paramètres comparées aux surfaces présentant des groupements -CH<sub>3</sub> et -COOH [165]. Le rôle important du FT dans le développement des thromboses associées aux

biomatériaux est également montré par l'utilisation de TFPI recombinant à la surface de greffons vasculaires en Dacron qui diminue de 18% la formation de fibrine [166]. Les monocytes activés libèrent également du FT dans la circulation sous forme de micro-vésicules qui **favorisent la propagation du thrombus** [167,168]. Ces micro-vésicules expriment à leur surface une molécule d'adhésion, PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) qui va permettre leur incorporation au sein des thrombi en se liant à la P-selectine des plaquettes [169,170]. Cette source de FT permettrait donc la formation de fibrine en continue [171].

Les **monocytes** et les **macrophages**, qui arrivent rapidement sur le site d'implantation du biomatériau, jouent un rôle essentiel dans le FBR et la résolution de l'inflammation. Plusieurs études ont montré que les macrophages sont capables de se lier naturellement aux biomatériaux implantés comme les céramiques, les ciments, les métaux, les polymères et le collagène [172]. Les biomatériaux vont induire une **polarisation pro-ou anti-inflammatoire** des macrophages qui va dépendre de ses **propriétés physico-chimiques** : sa forme, sa topographie, sa dégradabilité, son hydrophobicité et sa nature [173]. La chimie de surface influence beaucoup l'adhésion des monocytes/macrophages et la nature des cytokines qu'ils sécrètent. Par exemple, les polymères hydrophiles de charge neutre préviennent l'évolution des monocytes vers un phénotype de macrophage pro-inflammatoire et le phénomène de fusion des macrophages appelé cellules géantes à corps étranger (FBGC, « foreign body giant cells ») [174]. Les protéines adsorbées sur le biomatériau régulent également l'activité cellulaire des monocytes/macrophages. Différentes **protéines sériques** sont impliquées dans divers aspects de l'activité des monocytes/macrophages, notamment l'adhérence, l'apoptose, la libération de cytokines, la fusion des macrophages (FBGC) et la libération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [175,176]. Certaines protéines possèdent des séquences spécifiques reconnues par les monocytes qui peuvent favoriser l'adhésion, la fusion et la libération de cytokines. Cependant, l'activation des monocytes dépend de la disponibilité et de l'accessibilité de ces séquences qui peut être influencée par le biomatériau. De nombreuses protéines ont un effet sur l'adhésion des monocytes telles que, les immunoglobulines G (IgG), la vitronectine (Vn), la fibronectine (Fn), le vWF, le composant amyloïde P sérique ou encore le fibrinogène (Fg) [175,177–179]. Plusieurs de ces protéines comme le Fg, le kininogène de haut poids moléculaire, le FX et le C3b possèdent des sites reconnus par les  $\beta 2$  intégrines (Mac-1 ou  $\alpha M\beta 2$ ). Par exemple, la Fn et Vn possèdent des séquences Arg-Gly-Asp (RGD) qui sont reconnues par les intégrines  $\alpha V$ ,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ . Lorsque les monocytes atteignent le site d'implantation du biomatériau, l'inflammation est déjà présente [1]. Les médiateurs inflammatoires, sécrétés entre autres par

les neutrophiles, vont activer les monocytes et induire leur différenciation en macrophages et ensuite en « foreign body giant cell » (**Figure 20**).



**Figure 20** : Réponse du corps à l'introduction d'un biomatériau : Formation de cellules géantes à corps étrangers (FBGC) et encapsulation du biomatériau [150].

Selon l'activation des macrophages par le microenvironnement en lien avec le biomatériau, ceux-ci peuvent se polariser vers un état **pro-inflammatoire** (M1) ou **anti-inflammatoire** (M2) [180]. Au cours des premiers jours, leur différenciation est principalement dirigée vers l'état M1 qui se caractérise par la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) [181]. L'élimination des débris apoptotiques favoriserait le passage à des macrophages de type M2 qui sécrètent du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 atténuant ainsi la réponse inflammatoire [182].

Les **propriétés de surface** des biomatériaux influencent le comportement de macrophages. Par exemple, l'hydrophobie et l'ionocité sont impliquées dans la régulation de l'apoptose des macrophages adhérents [183,184] alors que la composition chimique et la topographie de surface des polymères modulent la libération de cytokines [185,186]. Les changements dans la réponse des monocytes / macrophages en fonction de la couche de protéine adsorbée détermineront l'étendue de la réponse inflammatoire, c'est-à-dire une acceptation du biomatériau ou une réponse inflammatoire chronique. En effet, l'état d'activation des macrophages peut entraîner la **formation de capsules fibreuses** et une défaillance du dispositif implanté. Si le biomatériau est trop volumineux pour être internalisé et dégradé, les

macrophages vont s'activer et subir une **phagocytose frustrée**, entraînant une forte libération de cytokines pro-inflammatoires [187,188]. En parallèle, la sécrétion d'interleukines 4 et 13 par les mastocytes, basophiles et lymphocytes T activés va induire la fusion des macrophages en cellules multi-nucléées (FBGC) à la surface du biomatériau dans le but d'accroître leur fonctionnalité phagocytaire. Cet événement est un marqueur de **l'inflammation chronique (Figure 20)** [189,190]. Les cellules qui subissent une fusion pour former le FBGC sont modifiées phénotypiquement par un stimulus IL-4 ou IL-13 [191,192] et, *in vitro*, la fusion semble se produire au niveau des récepteurs au mannose [193,194]. Les cellules multinucléées libèrent des médiateurs pro-inflammatoires, des enzymes de dégradation, des ROS, des facteurs de la coagulation et des cytokines qui vont contribuer à la dégradation du biomatériau [1,195]. Elles stimulent également la formation d'un tissu de granulation en sécrétant des facteurs tels que, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) [196], le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [197] et le facteur de croissance transformant bêta (TGF- $\beta$ ) [198], qui recrutent et activent les fibroblastes, ce qui entraîne un dépôt de collagène et la formation d'une capsule fibreuse autour du biomatériau empêchant ainsi toute interaction avec les tissus environnants. L'isolement au sein de la capsule ainsi que la sécrétion d'enzymes protéolytiques compromettent le bon fonctionnement du biomatériau.

## C. Les stratégies d'optimisation pour l'intégration du dispositif implanté

### 1. Amélioration de la biocompatibilité

De nombreuses stratégies de modification de surface des biomatériaux ont été mises en place afin d'améliorer la **biocompatibilité** du dispositif implanté et son intégration dans le corps humain. Pour des applications dans le domaine cardiovasculaire, l'objectif de ces modifications est de favoriser l'endothélialisation et de **prévenir la thrombose et l'inflammation**.



### a. Topographie de surface

La **topographie de surface** est connue pour influencer la réponse des cellules au contact de l'implant et donc l'intégration tissulaire de ce dernier. La modulation de ces propriétés topographiques interfaciales représente donc une voie stratégique pour favoriser et réguler l'acceptation du biomatériau au site d'implantation.

Parmi les caractéristiques topographiques aux interfaces, la **rugosité** représente un paramètre essentiel. Elle a une influence significative sur le comportement cellulaire, en particulier sur l'adhésion cellulaire. Une étude a montré qu'en augmentant la rugosité d'un polyuréthane de 10 à 100 nm, l'adhésion de cellules endothéliales était favorisée [199].

Un autre paramètre important est la **porosité** : la porosité interne des prothèses vasculaires est nécessaire à l'ancrage de la néo-intima et la porosité externe permet la colonisation de la prothèse par les tissus environnants [200]. Une étude récente a rapporté l'effet de la porosité de surface sur la croissance des cellules endothéliales et a montré que leur croissance était plus importante en présence de pores de faible diamètre (5-20  $\mu\text{m}$  de diamètre) avec une distance inter-pore faible [201]. La présence de pores permet donc une endothélialisation plus rapide [202]. Une autre étude a montré que la présence de nano-structure à la surface de matériaux avait une influence sur l'adsorption et la conformation des protéines ainsi que sur la réponse cellulaire [139].

### b. Propriétés physico-chimiques de surface

Les propriétés de surface d'un matériau peuvent également être modulées en modifiant sa **composition chimique**. En général, il est constaté que l'**hydrophilie** de la surface favorise l'adhésion des cellules [203–205]. Cependant, les surfaces **hydrophobes** favorisent une adsorption de protéines plus importante ce qui va donc modifier l'hydrophobie de la surface et favoriser l'adhésion cellulaire.

La modification de **charge** de surface a également largement été étudiée dans le domaine des biomatériaux vasculaires. En effet, des études précédentes ont montré que des surfaces composées de groupement  $-\text{NH}_2$  (charges positives) induisaient une infiltration de cellules inflammatoires plus importante *in vivo* [206–208] et la formation de capsules fibreuses

plus épaisses autour de l'implant fonctionnalisé [208,209]. Les charges de surface peuvent également influencer la façon dont les protéines vont s'adsorber. Une étude a mis en évidence que la répartition des blocs de co-polymère au sein de matériaux ayant la même composition chimique avait une influence sur l'adsorption et la conformation de la fibronectine [210].

### **c. Modification de surface par recouvrement**

#### **i. Recouvrement moléculaire**

Une autre stratégie permettant d'améliorer la biocompatibilité consiste à **recouvrir la surface du matériau (coating)** afin de masquer ses effets pro-inflammatoires et pro-thrombotiques en évitant le contact du substrat avec les fluides biologiques et les tissus.

Le recouvrement peut se faire de différentes manières : par **greffage covalent** de molécules bioactives (peptides RGD, molécules anti-thrombotiques ...), **adsorption physico-chimique, traitement par plasma, couplage, greffage chimique de polymère ...** Ces procédés ont pour but de promouvoir l'adhésion des cellules ainsi que leur prolifération, de limiter l'activation des cellules (plaquettes, leucocytes ...) ainsi que l'activation de la coagulation.

Bien souvent, les **protéines d'origine naturelle** sont utilisées, comme la fibronectine, le collagène, la vitronectine ou encore l'albumine. L'adsorption d'albumine permet de passiver la surface d'un biomatériau, d'améliorer la biocompatibilité et de prolonger les effets des implants [211]. Les surfaces traitées avec **l'albumine** ont été qualifiées de résistantes aux plaquettes car une diminution de l'adhésion et de l'activation des plaquettes a été observée [212–214]. Il est donc admis que l'albumine réduit la thrombogénicité des biomatériaux [213,215], et pourrait aussi réduire l'activation du complément [216] et l'adhésion des bactéries [211]. Par exemple, le revêtement d'albumine sur du Dacron améliore la biocompatibilité à court terme en diminuant le nombre de leucocytes et de plaquettes qui adhèrent à sa surface [212]. L'effet bénéfique de l'albumine serait dû à un recouvrement total de la surface (qu'elle soit hydrophobe ou hydrophile), son adsorption empêchant l'adsorption d'autres protéines telles que le fibrinogène [217,218]. Une autre hypothèse est que l'albumine ne possède pas les séquences peptidiques nécessaires à l'interaction avec les plaquettes, les leucocytes ou les enzymes de la cascade de la coagulation [215]. Cependant, une étude a montré qu'il n'y avait

aucune différence entre des implants revêtus d'albumine ou non, 8 mois après implantation et donc que ce revêtement ne permettait pas une meilleure intégration de l'implant [219]. Les effets à long terme du coating d'albumine restent donc discutables [215], et il est probable que ce coating se désorbe progressivement avec le temps [220] et que la protéine soit remplacée par d'autres protéines par effet Vroman (*abordé en section II.B.1.*). L'albumine, liée de manière covalente, se dénature aussi avec le temps [215] et cette dégradation du revêtement d'albumine a été observée 1 à 2 semaines après l'implantation [221].

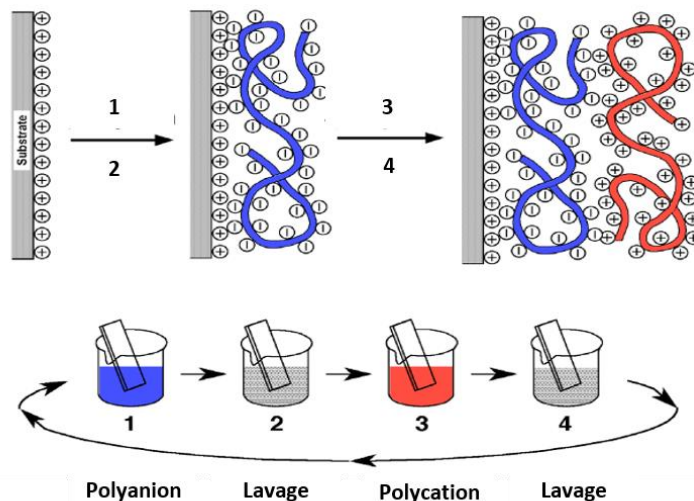
Le recouvrement de surface par de **l'héparine**, connue pour ses propriétés anti-coagulantes [222], est également couramment utilisé pour modifier la surface d'implants cardiovasculaires. Ainsi l'héparine a été immobilisée sur de l'acier inoxydable 316 L, du ePTFE, du PET ou encore des PUs [223]. L'immobilisation de l'héparine sur les stents est une approche utilisée dans la régulation de la thrombo-inflammation et pour empêcher l'activation des plaquettes et de la coagulation [224]. Des études ont montré que, pour des dérivations cardiopulmonaires, l'héparine réduisait la réponse inflammatoire [225,226]. Cependant, cette modification de surface n'a pas encore montré une réduction significative du nombre de complications post-opératoires [226,227].

D'autres stratégies ont été mises au point en greffant des **inhibiteurs de la thrombine** tels que l'hirudine et certains de ces dérivés comme la bivalirudine. Ces molécules permettent une inhibition du site actif de la thrombine et favorisent ainsi une meilleure hémocompatibilité [228]. D'autres **molécules anti-coagulantes et anti-plaquettaires** telles que l'oxyde nitrique (NO), la thrombomoduline, le clopidogrel, l'aspirine ou encore des inhibiteurs de la GPIIb/IIIa (abciximab, eptifibatide, tirofiban) sont utilisées dans des applications de recouvrement de surface de greffes vasculaires [229,230]. En effet, l'oxyde nitrique est, en partie responsable, du rôle protecteur de l'endothélium. Ce revêtement permet de moduler le tonus des vaisseaux sanguins, d'inhiber l'activation des plaquettes, l'adhésion des leucocytes et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses [231].

## ii. Développement de films multicouches

La méthode **Layer by Layer** (LBL) permet de générer des films minces de quelques centaines de nanomètres à quelques microns à la surface de matériaux. Elle a été développée par Decher en 1992 et consiste à déposer de manière successive des polyélectrolytes de charges

opposées sur une surface solide afin de former des couches minces [232] (**Figure 21**). Elle peut être réalisée de différentes manières : par **immersion** (« dip coating »), par **centrifugation** (« spin-coating ») ou par **pulvérisation** (« spray coating ») pour former un revêtement sur une surface.



**Figure 21** : Méthode Layer by Layer (LBL) : construction d'un film multicouche de polyélectrolytes

La principale force motrice de la formation de ces multicouches est l'**attraction électrostatique** entre le matériau et les charges opposées mais d'autres types d'interactions y contribuent également comme par exemple les interactions hydrophobes et hydrophiles. Cette technique présente de nombreux avantages : elle ne requiert l'utilisation d'aucun produit toxique, le dépôt est simple à mettre en œuvre et peut se faire sur n'importe quel type de surface quelle que soit sa géométrie.

Les **propriétés physico-chimiques** de ces films minces peuvent également être facilement modulées par le choix des polyélectrolytes, le pH et la force ionique des solutions utilisées, la réticulation, le nombre de couche, la nature de la couche terminale modifiant ainsi les propriétés de rigidité, de charge de surface, d'épaisseur de ces films et de rugosité. En fonction de leur nature chimique, la force d'interaction entre les polyélectrolytes sera différente et jouera un rôle sur la croissance du film (linéaire ou exponentielle) et sur sa stabilité. Le choix des polyélectrolytes se fait en fonction de l'application visée. Une étude précédente a montré que l'élaboration d'un échafaudage tubulaire multicouche à base de poly(L-lactide-co-caprolactone), de collagène et de chitosan a permis d'accélérer l'endothélialisation [233].

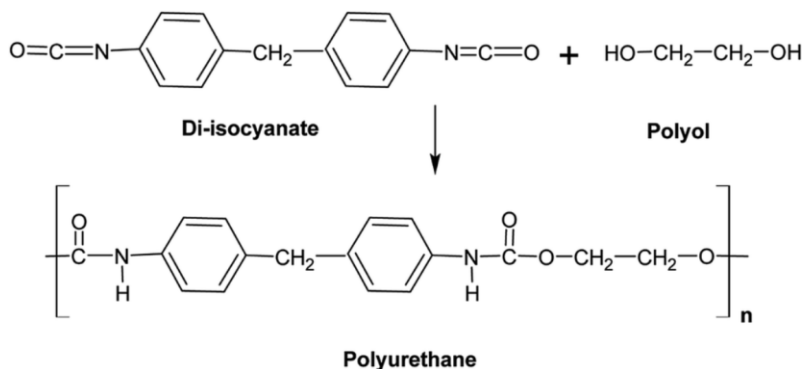
Les multicouches peuvent également servir de **réservoir** pour la délivrance contrôlée de molécules bioactives par diffusion simple ou par dégradation du film. La possibilité de pouvoir incorporer des molécules bioactives dans le film est un avantage considérable au regard des applications médicales étudiées précédemment (les stents et les substituts vasculaires). Par exemple, l'autoassemblage couche par couche de deux polysaccharides, le hyaluronane et le chitosan, a été utilisé pour concevoir des revêtements bioactifs pour des endoprothèses vasculaires. Le revêtement multicouche contenait du nitroprussiate de sodium, un vasodilatateur. L'étude a montré que ce système permettait de réduire l'adhésion des plaquettes [234].

**Il existe donc diverses stratégies permettant d'améliorer les propriétés de surface des biomatériaux dans le but de s'affranchir des problèmes rencontrés lors de l'implantation de dispositifs médicaux. Néanmoins, de nombreux problèmes persistent comme, par exemple, la perte de l'intégrité du biomatériau liée aux contraintes mécaniques et physiques lors de l'implantation ou encore la stabilité des recouvrements. Pour remédier à ces problèmes, des solutions sont proposées en utilisant, entre autres, des matériaux à base de polymère.**

## 2. Développement de polymères spécifiques : le D-PHI

Les **polymères** sont de bons candidats pour le recouvrement d'implants cardiovasculaires. En effet, ils possèdent des propriétés physico-chimiques modulables et sont présentés comme biocompatibles pour des applications de contact avec le sang. Les développements de polymères pour ces applications sont donc nombreux.

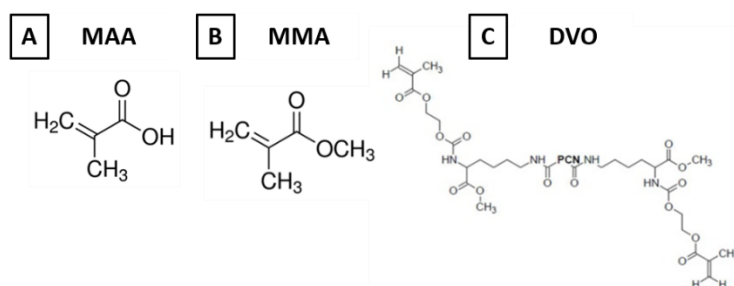
Les **polyuréthanes** (PU) représentent une classe de polymères segmentés possédant une unité de répétition d'uréthane (RO-CO-NR'H) [235] (*Figure 22*). Classiquement, ces polymères sont constitués de 3 composants principaux : le polyol, le diisocyanate et l'allongeur de chaîne. Les polyols représentent le segment mou (flexible) tandis que le diisocyanate et l'allongeur de chaîne représentent le segment dur (rigide).



**Figure 22** : Structure classique et synthèse d'un polyuréthane

Les polyuréthanes sont des **blocs de copolymères** composés alternativement de segments mous et durs. Ils peuvent subir un processus de séparation en micro-phase. Le choix des composants du copolymère à blocs a un impact sur ses caractéristiques mécaniques, telles que la résistance à la traction, le module d'élasticité et l'allongement, les produits de dégradation, et le taux de gonflement [236]. Ainsi, en faisant varier le type et la composition de chaque séquence, une large gamme de propriétés peut être obtenue. Cette chimie, ces propriétés mécaniques et cette compatibilité ont rendu les PUs attractifs pour l'utilisation biomédicale [237–239]. En effet, la thrombogénicité des PUs est semblable à celle du ePTFE (couramment utilisé pour les substituts vasculaires) [240]. Cependant, le PU ne présente pas que des avantages. En effet, la stabilité des implants en PU peut être affectée par les macrophages activés qui vont sécréter des enzymes protéolytiques (estérase par exemple) et entraîner la dégradation du polymère en di-amines aromatiques toxiques [241,242]. De ce fait, des PUs ont été conçus pour générer des produits relativement non cytotoxiques *in vivo* après dégradation hydrolytique ou enzymatique [241]. L'idée de pouvoir moduler les composants des PUs afin de contrôler les produits de dégradation représente un avantage considérable quant à la fabrication de biomatériaux pour des applications de contact avec le sang.

**Le D-PHI** (Degradable Polar/Ionic/Hydrophobic) est un polyuréthane polyfonctionnel conçu par le groupe du docteur *J P Santerre* (University of Toronto). Ce polymère a été développé comme alternative pour des applications d'ingénierie des tissus vasculaires et plus particulièrement de prothèses vasculaires de petit diamètre (<6mm) [9,10,243,244]. La synthèse du D-PHI est réalisée par une réaction de polymérisation radicalaire induite par la chaleur. Pour cela, 3 monomères et un initiateur de polymérisation sont nécessaires : **l'oligomère de divinyl (DVO)**, **l'acide méthacrylique (MAA)** et **le méthacrylate de méthyle (MMA)** (*Figure 22*).



**Figure 23** : Représentation schématique des monomères qui composent le **D-PHI** : A) Acide méthacrylique (MAA), B) Méthacrylate de méthyle (MMA) and C) Divinyl Oligomère (DVO) [9]

Le DVO apporte le caractère **polaire mais non ionique** et présente de multiples carbonates et uréthanes avec des groupes accepteurs et donateurs de protons. Le MAA confère le caractère **ionique** et le MMA apporte le caractère **hydrophobe** avec la présence de son groupe méthyle sur la chaîne latérale. Cette réaction nécessite un initiateur de polymérisation, le peroxyde de benzoyle (BPO), pour permettre la copolymérisation. Sa concentration a été optimisée pour maximiser la conversion des monomères [9]. La formule originale appelée **O-D-PHI** est synthétisée avec des ratios molaires de 1 : 5 : 15 pour le DVO : MAA : MMA. La deuxième formulation appelée **H-HHI** (High Hydrophobic, High Ionic) est obtenue en faisant varier la teneur en monomère hydrophobe (MMA) et anionique (MAA) par rapport à la teneur en DVO avec des ratios molaires de 1 : 20 : 39 pour le DVO : MAA : MMA.

Le DVO est obtenu par réaction de polycarbonate (PCN) qui représente le segment mou et de diisocyanate de lysine (LDI) et de méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) qui représentent les segments durs avec des ratios molaires de 2 : 1 : 2. Les composants des segments durs et mous présentent le potentiel de produire les propriétés mécaniques souhaitées [9]. De plus, les principaux composants, y compris le PCN et le LDI, ont été sélectionnés pour améliorer la biocompatibilité en se dégradant en matériaux relativement non cytotoxiques (lysine, dioxyde de carbone et hexane diol) [9].

Une étude précédente chez le rat a montré qu'après une période d'implantation de 100 jours, la perte de masse des échafaudages (scaffolds) de O-D-PHI était de 21%. Elle est plus lente et plus progressive que la décomposition du PLGA qui se produit généralement entre 30 et 45 jours après implantation [243]. Cette étude a également montré que la fibrose locale et

l'activité des cellules inflammatoires étaient significativement réduite avec le O-D-PHI. Celui-ci possède un module d'élasticité (0.5 kPa) et une résistance à la traction (45%) similaires à ceux des vaisseaux humains [9]. Une adsorption importante de protéines a été observée sur ce polyuréthane comparée au polystyrène pour la culture cellulaire (TCPS) et au PLGA et cette couche de protéine s'est avérée diminuer l'activation pro-inflammatoire des monocytes comparée aux deux autres surfaces [10]. Enfin des particules de O-D-PHI en solution favorisent une activation réduite des plaquettes, de la voie intrinsèque de la coagulation et du système du complément [245] même après dégradation du polyuréthane [246]. Ce D-PHI possède donc des **propriétés potentiellement intéressantes** pour des applications d'ingénierie cardiovasculaire.

**C'est dans ce contexte que s'insère le travail de cette thèse. Les objectifs ont été :**

- **i) D'étudier l'interaction de ce polyuréthane avec les protéines plasmatiques.**
- **ii) De développer des films minces utilisables pour le recouvrement de surfaces métalliques comme le cobalt chrome qui est utilisé dans la fabrication des endoprothèses vasculaires.**
- **iii) D'étudier l'hémocompatibilité de ce recouvrement comparé au métal nu.**



## **Chapitre 3 : Résultats & Discussion**

---

## I. Article 1

### **Mono vs multilayer fibronectin coatings on polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: Altering surface interactions with human monocytes**

**Audrey Gossart<sup>a,b</sup>, Kyle G. Battiston<sup>a</sup>, Adeline Gand<sup>b</sup>, Emmanuel Pauthe<sup>b</sup> and J Paul Santerre<sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering (*IBBME*) and the Faculty of Dentistry, *University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada*

<sup>b</sup> Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules (*ERRMECe*), Institut des Matériaux, Maison International de la Recherche, *Université de Cergy-Pontoise, 95000 Neuville sur Oise, France*

\* Corresponding author: Dr. J. Paul Santerre,

J Paul Santerre, Professor, Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering, Ted Rogers Centre for Heart Research, Translational Biology and Engineering Program, Faculty of Dentistry, University of Toronto, 661 University, 14th floor, room 1435, Toronto, Ontario, M5G 1M1 ; Phone: 416-946-8158 (primary phone number); Fax: (416) 979-4760 ; email: [paul.santerre@utoronto.ca](mailto:paul.santerre@utoronto.ca); lab website: <http://www.santerrelab.com>

**Key words:** Polyurethane, Fibronectin, Monocyte, Layer-by-Layer, Surface chemistry

This work has been published in the journal : **Acta Biomaterialia**, **Volume 66**, **15<sup>th</sup> January 2018**, Pages 129-140

### Résumé

Lors de l'implantation d'un biomatériau, une réaction du tissu se produit entraînant une réponse inflammatoire. Les monocytes ont un rôle important dans cette réponse car ils arrivent rapidement sur le site d'implantation et participent à l'inflammation locale et systémique. Un polyuréthane polaire/hydrophobe/ionique (D-PHI) a été mis au point dans le but de favoriser une réponse anti-inflammatoire des monocytes pour des applications d'ingénieries tissulaire. Il est composé de 3 monomères : le divinyl oligomère (DVO) qui apporte le caractère polaire non ionique, l'acide méthacrylate (MAA) qui apporte le caractère ionique et le méthyle méthacrylique (MMA) qui apporte le caractère hydrophobe. La formulation originale appelée O-D-PHI est obtenue avec des ratios molaires de 1 : 5 : 15 respectivement pour le DVO : MAA : MMA. En faisant varier les ratios molaires, il est possible de moduler les propriétés de ce polyuréthane. Une autre formulation a donc été développée, le HHHI (High Hydrophobic, High Ionic), avec des ratios molaires de 1 : 20 : 39 où les caractères ionique et hydrophobe ont été augmentés par rapport au caractère polaire. Ces polyuréthanes ont été biofonctionnalisés avec de la fibronectine (Fn) afin de générer un matériau biomimétique de type matrice extracellulaire, compte tenu de son rôle important dans de nombreux processus physiologiques. L'objectif de ces travaux était, dans un premier temps, d'étudier l'influence de la chimie intrinsèque des matériaux D-PHIs (O-D-PHI et HHHI) sur l'adsorption (mono ou multicouches) et la disponibilité de séquences spécifiques de la Fn (Cell Binding Domain (CBD), N terminal domain et C terminal domain) afin de déterminer l'importance des caractères polaire, hydrophobe et ionique sur le revêtement de Fn en simple couche ou en multicouche (Poly-L-Lysine/Fn). Dans un deuxième temps, l'objectif était d'étudier l'influence de la chimie de ces polyuréthanes ainsi que la présence de Fn (simple ou multicouche) sur l'activité des monocytes.

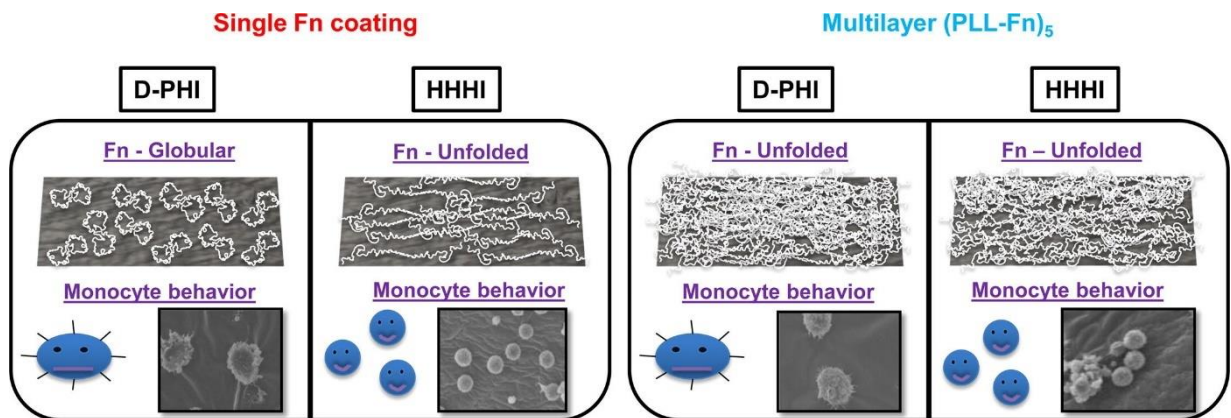
Les résultats ont montré que la Fn s'adsorbait différemment, suivant la formulation de D-PHI et le revêtement simple ou multicouche, avec une quantité et une disponibilité de séquences spécifiques de la Fn (Cell Binding Domain et N terminal Domain) différente. Ainsi, lorsque la Fn est adsorbée en monocouche, la disponibilité des séquences spécifiques est plus importante sur le O-D-PHI que sur le HHHI. Lorsque la Fn est présente sous forme de multicouche, les disponibilités des 3 séquences étaient faibles pour les 2 matériaux, excepté pour le domaine N terminal qui restait toutefois plus élevé sur le O-D-PHI. Les résultats ont également mis en évidence que le comportement des monocytes dépendait fortement de la chimie intrinsèque du matériau mais pas de la présence des revêtements de Fn. L'activation des

monocytes s'est révélée plus faible sur le polyuréthane HHHI (contenant les caractères ionique et hydrophobe les plus élevés), que la Fn soit présente ou non.

Ces résultats soulignent donc l'importance de l'hétérogénéité chimique des surfaces pour la conception de biomatériaux. Le fait que la présence de la Fn, en simple ou multicouche, sur les polyuréthanes n'ait pas masqué les effets de la chimie de surface sur l'activation des monocytes laisse la possibilité de pouvoir incorporer des molécules thérapeutiques au sein de ces multicouches afin de mieux diriger le comportement cellulaire et l'intégration du biomatériau.

*Note* : dans cet article la formule originale O-D-PHI est appelé D-PHI

**Graphical abstract**



## Abstract

Monocyte interactions with materials that are biofunctionalized with fibronectin (Fn) are of interest because of the documented literature which associates this protein with white blood cell function at implant sites. A degradable-polar hydrophobic ionic polyurethane (D-PHI), has been reported to promote an anti-inflammatory response from human monocytes. The aim of the current work was to study the influence of intrinsic D-PHI material chemistry on Fn adsorption (mono and multi-layer structures), and to investigate the influence of such chemistry on the structural state of the Fn, as well as the latter's influence on the activity of human monocytes on the protein coated substrates. Significant differences in Fn adsorption, surface hydrophobicity and the availability of defined peptide sequences (N terminal, C terminal or Cell Binding Domain) for the Fn in mono *vs* multilayer structures were observed as a function of the changes in intrinsic material chemistry. A D-PHI-formulated polyurethane substrate with subtle changes in anionic and hydrophobic domain content relative to the polar non-ionic urethane/carbonate groups within the polymer matrix promoted the lowest activation of monocytes, in the presence of multi-layer Fn constructs. These results highlight the importance of chemical heterogeneity as a design parameter for biomaterial surfaces, and establishes a desired strategy for controlling human monocyte activity at the surface of devices, when these are coated with multi-layer Fn structures. The latter is an important step towards functionalizing the materials with multi-layer protein drug carriers as interventional therapeutic agents.

## 1. Introduction

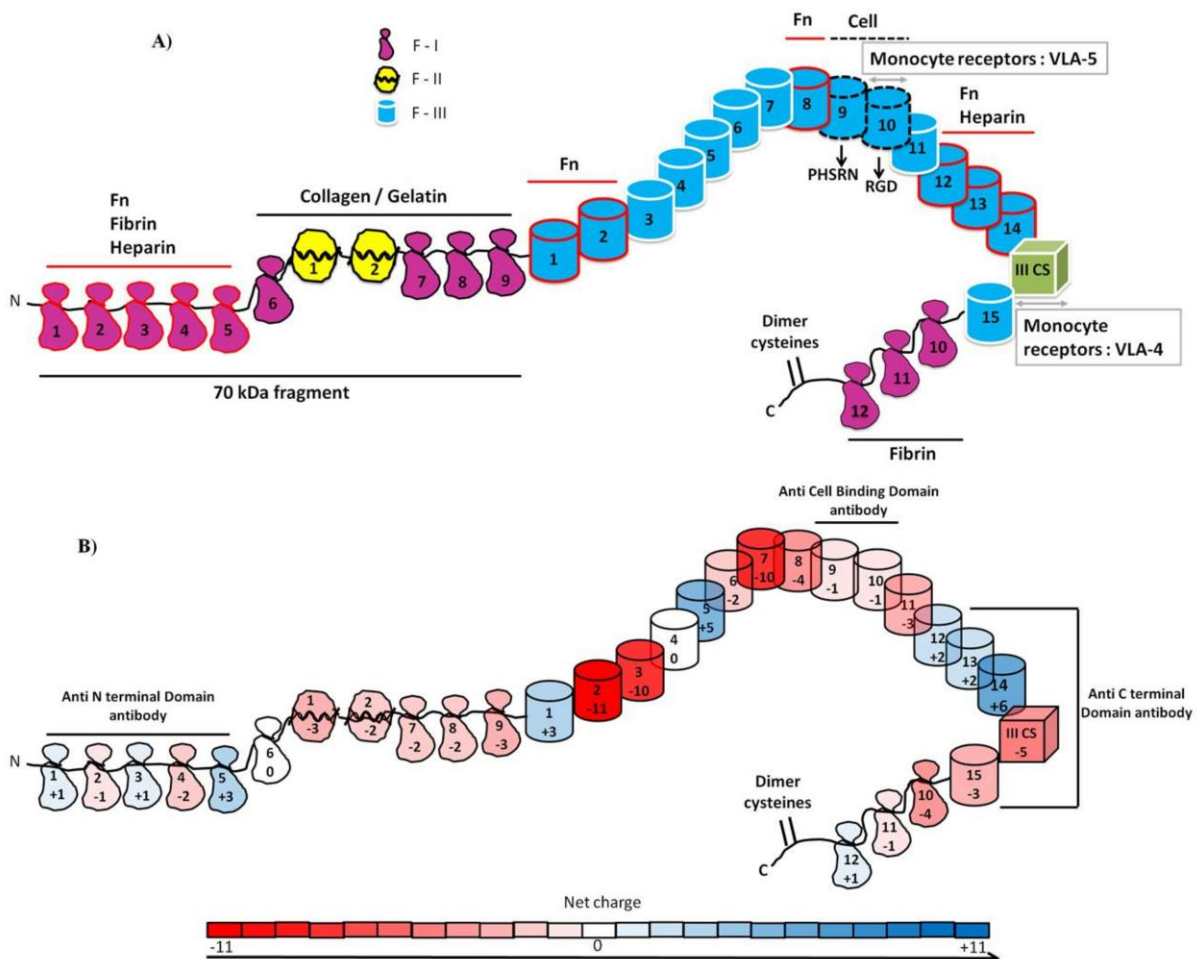
Monocytes are an important class of white blood cells that interact with platelets and endothelial cells in the vasculature and are among the first cells to respond to tissue and biomaterial surfaces after tissue injury resulting from implantation [1, 2]. As well, they play an important role in guiding inflammatory processes and wound healing around the implant [2]. Over recent years the authors have studied polyurethane materials which promote a reduced inflammatory response by human blood monocytes. Specifically, this includes a polyfunctional polyurethane (called D-PHI), containing in the original formula, a divinyl oligomer –DVO-, methacrylic acid –MAA- and methyl methacrylate –MMA-, with the molar ratio 1/5/15, respectively. As shown in *Supplementary Figure S1*, MMA provides hydrophobic character because of its pendent methyl group on the side chain. The MAA

monomer has a pendent carboxylic acid and hence is hydrophilic. The urethane divinyl oligomer is polar but not ionic, and has multiple carbonate and urethanes with proton acceptor and donor groups. This D-PHI has been shown to be biocompatible and non-toxic to cells when used in the engineering of vascular tissues with vascular smooth muscle cells (VSMCs) [3], endothelial cells [4] and fibroblasts [5]. D-PHI has been shown to reduce the pro-inflammatory activation of monocytes when compared to tissue culture polystyrene (TCPS) and polylactic glycolic acid (PLGA) [6, 7]. The block structure chemistry of D-PHI can be altered by varying the hydrophobic (MMA) and anionic (MAA) monomer content relative to the polar divinyl oligomer (DVO) content to obtain formulations that interact with monocytes differentially [6]. The polar, hydrophobic and ionic character presents an opportunity to display diverse chemical group distributions at material surfaces within different environments such as protein solutions. Such chemical group diversity is not unlike the variation in chemical groups that are also exhibited by different peptide residues found in proteins. Previous research showed that D-PHI's unique chemical structure enables a very high protein adsorption in comparison to tissue culture polystyrene (TCPS) and PLGA [7], and in particular directs specific binding site exposure states for adsorbed immunoglobulin G (IgG), that modulates cellular responses, and specifically those of monocytes [6].

There has been much interest in the literature over the years to apply biofunctionalization approaches using protein coatings in order to influence cellular interactions since when living cells interact with a material's surface, they do not actually contact the molecular structure of the material surface alone, but rather, they interact with the nature and supramolecular organisation of the adsorbed water/ protein layer [8]. Given that D-PHI appears to function based on its ability to interact with the different elements of IgG to modulate monocyte response [6], it was of interest to further explore the potential interactions of other dominant proteins which interact with these cells [9].

In living tissue, cells interact with their molecular micro-environment, *e.g.* extracellular matrix (ECM). The ECM is a complex network composed of many molecules secreted by cells, including Fibronectin (Fn), a glycoprotein. Fn is of particular interest because previous studies suggest that inflammation produces proteolytic enzymes that cleave Fn. These Fn fragments then selectively recruit monocytes [9] and stimulate the chemokinesis/chemotaxis of monocytes [10-12]. Fn is composed of two subunits of 220 kDa which are linked together by disulfide bonds at their C terminal (**Figure 1.A**) [13]. The structure and the stability of the human plasma Fn are well known [13-15]. It is primarily

made up of three types of repeating modules (I, II and III) (**Figure 1A**) [16, 17], which contains domains for binding to a range of extracellular and cell surface molecules [13]. Fn exists in a compact soluble form within plasma and an unfolled fibrillar form within ECM [18]. Substantial evidence supports the idea that Fn must be activated to assemble into fibrils [19-21]. Further, RGD and PHSRN peptide sequences on Fn are known to promote the adhesion and spreading of monocytes / macrophages [22]. Among other groups, monocytes present on their surface, two types of receptors that interact with Fn [23]. VLA-5 interacts with the RGD sequence [24] and VLA-4 interacts with the CS-1 and the CS-5 regions of the III CS domain (type III connecting segment) of the human plasmatic Fn [25, 26] (**Figure 1.A**). The IIICS domain of Fn is variable in nature and is located on only one of the two dimer units [27] and is capable of interacting with VLA receptors among the integrin superfamily [28].



**Figure 1:** Fibronectin schematic at pH 7.4 : A) Fn structure : F-I = domain type I, F-II = domain type II and F-III = domain type III [19, 24, 26, 67, 68]. B) Distribution of Fn charge on the different domains.



Given the intriguing protein biology of Fn, many investigators have been interested in studying Fn adsorption to biomaterial substrates. This work has particularly focused on looking at the difference in the exposure of key protein binding sites, and in particular changes in antibody recognition of the protein's peptide sequence that is achieved according to different surfaces (hydrophilic vs. hydrophobic), and its effect on cell behavior [29-32]. However, more and more studies are now focusing on the ability of Fn to complex with other molecules in order to form bio-engineered multilayers [33-36] for specific applications. Hence, the shift in thinking of Fn as a single coating (*e.g.* 2D interface) to a multilayer construct (*e.g.* 3D interface) has attracted much interest since it could allow one to use multilayer constructs as a biomolecular tank, taking advantage of Fn's ability to entangle with complex macromolecules. Such complex multilayer films can also be bioactivated via insertion of biomacromolecular species such as proteins [37], DNA [38], polymer/DNA complexes [33] or growth factors [39]. The use of thin polyelectrolyte multilayer films obtained from Layer-by-Layer assembly (LbL) has been particularly appealing for applications where cell-biomaterial interactions [40] are intentionally directed at bio-functionalized surfaces. A previous study showed that multilayer (PLL-PGA) loaded in BMP-2 allowed the biomolecule to be released and subsequent myoblast cells, cultured on the materials, to differentiate into osteoblasts [39]. The investigators have extended their knowledge of Fn interactions with substrates into the 3D realm by focusing on the use of multilayer coatings composed of poly-L-lysine (PLL), a biodegradable polyelectrolyte and Fn. A previous study has described the nature of the electrostatic complexation between negatively charged Fn and positively charged PLL [34, 41], where the work highlighted the unique protein structure of Fn to be an important factor (more so than film charge or number of layers) in controlling the interaction between multilayer films and living cells [34]. Given the interactive relationship previously defined between other serum and plasma proteins with D-PHI and human monocytes [7], it is hypothesized here that an adsorbed Fn protein in single or multilayer forms (PLL-Fn)<sub>5</sub>, at the material interface, would also be able to establish unique protein configurations, that would minimize the response of monocytes to the polyurethane materials, and be dependent on the subtle changes in chemical groups within those D-PHI type polyurethane formulations. The interactions of Fn with biomaterial surfaces such as D-PHI becomes even more important when one considers the possibility of generating multilayered structures of Fn on substrates, with the intention to harbour growth factors or biomolecules.

The first aim of the current work was to study the intrinsic influence of D-PHI material chemistry on Fn adsorption and its influence on peptide presentation to antibodies that would recognize those peptide sequences on Fn, in order to determine the relative importance of the polar vs hydrophobic and anionic nature of D-PHI, on the developed Fn coatings (for both single and multilayer structures). Secondly, it was desired to investigate the influence of D-PHI chemistry and its surface directed Fn structures, either in single layer or multilayer form, on the activity of human monocytes. The intrinsic interest of this work is aimed at gaining a better understanding of the relationship between D-PHI's chemical composition and the protein rearrangement of Fn with respect to monocyte activity.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. D-PHI film preparation

D-PHI synthesis was carried out by free radical polymerization of a divinyl oligomer (DVO), Methacrylic Acid (MAA) and Methyl Methacrylate (MMA) with different molar ratios, varying the anionic (MAA) to hydrophobic (MMA) ratio relative to polar non-ionic character (DVO) (*Supplementary Figure S1*). The DVO is obtained by the reaction of hydroxyethyl methacrylate (HEMA), poly (hexamethylene carbonate) diol (PCN) and lysine diisocyanate (LDI) [3]. Respectively for DVO : MAA : MMA, the formulation referred to as original D-PHI had a 1 : 5 : 15 stoichiometry, whereas HHHI (High Hydrophobic, High Ionic) was 1 : 20 : 39 [6]. The polymerization initiator used is benzoyl peroxide (BPO), and was incorporated into the reaction at a ratio of 0.0032 mol of BPO per mole of vinyl group from the 3 associated monomers, and the chemistries were previously described in great detail elsewhere [3, 6]. The homogenization of the 3 monomers with the polymerization initiator was carried out at room temperature for 20 h with stirring and protected from light. 50  $\mu$ L of viscous solution was deposited in 96-well polypropylene plates and the polymerization was performed at 110°C for 24 h under nitrogen [6, 7]. The thickness of polyurethane films was approximately 1.4 mm (measured by scanning electron microscopy) and the root mean square (rms) roughness of the surfaces was measured by atomic force microscopy (dimension ICON microscope from Bruker) to vary between 5 and 21 nm across the surfaces. The two materials were shown to be similar smooth and featureless based on scanning electron microscopy images (*Supplementary Figure S2*); and to have a similar atomic composition at the polymer

surfaces based on X-ray spectroscopy methods (described in section 2.4.5) (**Supplementary Table S1**).

## 2.2 Fn preparation

Fn was purified from human plasma following a three-step affinity chromatography process, as previously described by Poulouin *et al.* [42]. This purification process has been shown to provide a protein solution exhibiting a purity of approximately 98% (w/w). Fn concentration was determined by optical absorbance measurement  $A^{1\%}_{280\text{nm}} = 12.8$  ( $\epsilon = 1.28 \text{ g.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  at 280 nm for a 1g/L solution of Fn).

## 2.3 Fn deposition

Thin films were assembled on polyurethane disks synthesized in 96-well plates (diameter: 6.5 mm) [note: surface area is accounted for in all data analysis]. All surfaces were treated with 70% ethanol overnight and rehydrated by the addition of sterile filtered phosphate buffered saline (PBS) overnight. The biofunctionalization was generated using well established protocols in the laboratory which have already defined the conditions for the formation of stable films [41]. Either a single Fn coating (during 10min with Fn at 0,1 mg/mL) or Layer-by-Layer deposition of oppositely charged components (alternating five times between the two charged polymers for a total of 10 layers) (PLL-Fn)<sub>5</sub> were applied to the polyurethane substrates [41]. Specifically, poly-L-lysine 70-150 kDa (PLL) (0.1 mg/mL) was used as the polycation and human plasmatic Fn (0.1 mg/mL) as the polyanion (*e.g.* Fn has an acidic isoelectric point (pI=5.5-6.0) and is most negatively charged at pH 7.2 [43]) (**Figure 1.B**). We chose to work with PLL because it is a natural positive polyelectrolyte made of a key amino-acid, lysine, which upon degradation could be metabolised into an amino-acid (*e.g.* lysine) needed for the synthesis of new proteins [44, 45]. Solutions were allowed to adsorb for 10 min to generate each layer and then were withdrawn. Surfaces were gently rinsed 3 times for 1 min in PBS between each coating.

## 2.4 Characterization of surfaces

### 2.4.1 Contact angle

The samples were dried at room temperature for 48 h in a desiccator and the contact angle measurements were performed using a micro syringe to deposit a 10  $\mu\text{l}$  drop of water (with an 18M-Ohm resistivity) on the D-PHI films. Values were measured for three drops on each of 3 separate samples per test group, with the different drops being in different locations.

The contact angle measurements were performed on a Kruss optical analyser. All of these 9 measurements generated an average static angle measurement. A control measurement to assess the possible affects of PLL itself that may have contaminated the outer surface, if not completely coated with Fn was assessed prior to the experiments with Fn and showed no affect on values relative to the control surfaces themselves (D-PHI =  $81.1 \pm 1.1$  vs D-PHI+PLL =  $77.7 \pm 1.9$ ; HHHI =  $82.4 \pm 3.9$  vs HHHI+ PLL=  $80.6 \pm 2.1$ ).

#### 2.4.2 Total protein quantification

Samples were coated with a monolayer of Fn or a thin film of (PLL-Fn)<sub>5</sub> as described in section 2.3. Samples were incubated in 120  $\mu$ L of 2% sodium dodecyl sulfate (SDS) for 24 h at room temperature. The bicinchoninic acid (BCA) assay was undertaken according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific) [6]. After elution by SDS, the surface was assessed for residual protein by BCA assay, and none could be detected above the background of the polymer itself, confirming the effectiveness of the SDS treatment for protein removal.

#### 2.4.3 Quantification of Fn using monoclonal antibodies

The presentation of Fn epitopes in the adsorbed protein state was measured by an ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). After coating and rinsing with PBS, samples were incubated with monoclonal antibodies against specific soluble Fn sequences for 1h at room temperature: anti Cell-Binding Domain (dilution 1/30000) (abcam, ab26245) (III-9/10 domain), anti N Term (dilution 1/43000000) (Millipore, MAB1936) (I-1 to 5 domain) and anti C Terminal (dilution 1/667) (Santa Cruz Biotechnology, P5F3) (III-13 to 15 domain). Samples were then rinsed with PBS Tween 0.05%, and incubated with a secondary antibody, anti-mouse IgG (dilution 1/1000) (Thermo scientific, prod#31430) for cell-binding and N Term, and secondary antibody anti-mouse IgM (dilution 1/1000) (Santa Cruz Biotechnology, sc-2064) for C Term 1 h at room temperature. TMB (tetramethylbenzidine) substrate was then added on the sample and was incubated for 10 min at room temperature. The reaction was stopped with 2N sulfuric acid, and the absorbance read in a microwell plate reader at 450 nm. Bovine serum albumin (BSA) was used as a control to assess for non-specific interactions. The findings showed virtually no absorbance of significance from the antibodies for these controls (*Supplementary Table S2*). The absorbance was normalized to total Fn in order to provide a means of discussing the Fn data in relation to the two materials for a given mono or multilayer.

#### **2.4.4 Immunofluorescence**

The visualization of the Fn coating on the different polyurethanes was carried out with an Fn fluorescently labeled with Alexa 568 using LSM710 confocal laser scanning microscopy (CarlZeiss) in order to assess for uniformity of the protein distribution (*Supplementary Figure S3*).

#### **2.4.5 Atomic composition of surface (Energy dispersive X-ray spectrometry)**

Samples subjected nickel metallization and Scanning electron microscopy (SEM) images were recorded with a LEICA S430i microscope. The same field of view was then scanned using an energy-dispersive X-ray spectrometer (EDS) to acquire a set of X-ray maps for C, O and N using the PhiRhoz method (Leo UIF software) in order to characterize the atomic composition of the two polymer surfaces. EDS was carried out 3 times with 3 different samples and 5 different spots per sample.

### **2.5 Cell culture**

#### **2.5.1 Monocyte isolation and culture**

Monocytes were isolated from whole blood obtained from healthy volunteer donors at Mount Sinai Hospital, Toronto, Ontario (University of Toronto ethics approval #22203) [6, 7]. 18 ml of blood were added to 20 mL of Histopaque-1077 and centrifuged at 2000 rpm for 30 min. The top layer of the plasma platelet-rich phase was removed and the leukocyte layer containing the monocytes and the Histopaque layer were transferred to a new tube. Several washes with RPMI medium containing EDTA and FBS were performed [46]. Monocytes were seeded (200 000 cells/P96 well) onto the different samples and cultured for 24 and 72 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

#### **2.5.2 Scanning electron microscopy (SEM)**

Samples were fixed with a 3% glutaraldehyde solution overnight, subjected to ethanol dehydration, and critical point dried prior to sputter coating (8 nm platinum). Samples were analyzed using a Hitachi S 2500 Scanning Electron Microscope (Hitachi, Mito City, Japan) at an operating voltage of 10kV (Faculty of Dentistry, University of Toronto).

### 2.5.3 Metabolic activity

Samples were incubated with WST-1 reagent (water-soluble tetrazolium-1; Roche, Mississauga, Canada) for 1 h at 37°C, after which absorbance was measured at 450 nm. After reading the absorbance, samples were conserved to quantify DNA mass.

### 2.5.4 DNA mass quantification

Samples were incubated with lysis buffer containing 1% Triton X-100, 100 mM EDTA and PBS (pH=7.2) for 1 h on ice. For the analysis, 10 µL of cellular lysate was mixed with 1xTNE (Tris/NaCl/EDTA) and Hoechst 33258 DNA stain, and compared to DNA standards prepared from calf thymus DNA. Fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths of 360 and 460 nm, respectively [46].

### 2.5.5 Enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs) for cytokines

Pro-inflammatory (TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory (IL-10) biomarkers were measured in the supernatants according to the manufacturer's instructions (eBioscience). Supernatants were collected 18 h after the medium change to quantify the cytokines released by the cells during the defined period.

## 2.6 Statistical analysis

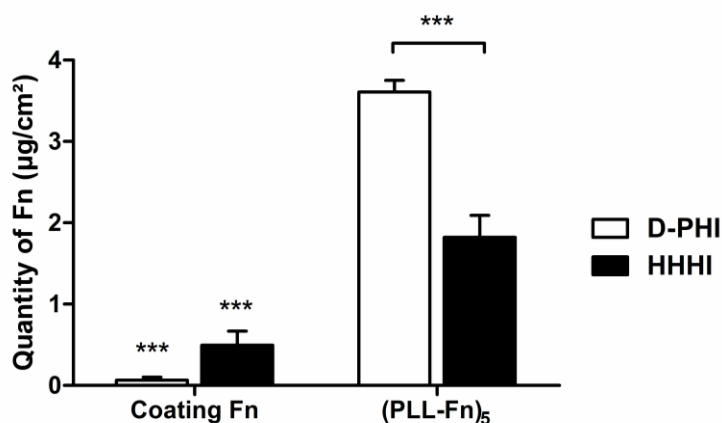
Statistical analysis was performed with SPSS Statistics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) by analysis of variance (ANOVA) or by an independent samples t-test, where appropriate, with statistical significance reported for  $p < 0.05$ . All experiments were repeated in triplicate with three technical replicates for each experimental value. Experiments performed with monocytes were repeated with three distinct donors.

## 3. Results

### 3.1 Analysis of the influence of surface chemistry on Fn protein interactions

The quantity of Fn adsorbed, as a monolayer or within a (PLL-Fn)<sub>5</sub> multilayer films, on the different polyurethanes D-PHI (*i.e.* original formulation) and HHHI (*i.e.* high anionic content relative to original D-PHI) is shown in **Figure 2**. The level of adsorbed Fn with a simple Fn coating is very different on the two different polyurethanes formulation. The results show that a smaller quantity of Fn is present on D-PHI (0.06 µg/cm<sup>2</sup>) whereas on the HHHI material the Fn deposited quantity reach 0.5 µg/cm<sup>2</sup>. In both cases the base coating of Fn is

very well distributed (see confocal images in **Supplementary Figure S3**). The latter result is consistent with the standard quantity of Fn generally adsorbed at interfaces when a homogeneous monolayer of Fn covers the surface [47]. The quantity of Fn deposited on the two polyurethanes based-materials within the multilayer film yielded slightly different amounts but exceeded their respective monolayers. The amount of Fn adsorbed within the (PLL-Fn)<sub>5</sub> multilayer is two times lower on HHHI when compared to that of the original D-PHI (1.8 μg/cm<sup>2</sup> vs 3.6 μg/cm<sup>2</sup> respectively). This demonstrates that the quantity of Fn adsorbed on D-PHI is highly differentiated for the monolayer vs multilayer deposition. The relative amount of anionic and hydrophobic character of the materials seems to play an important role in Fn structure at the polyurethane interfaces.

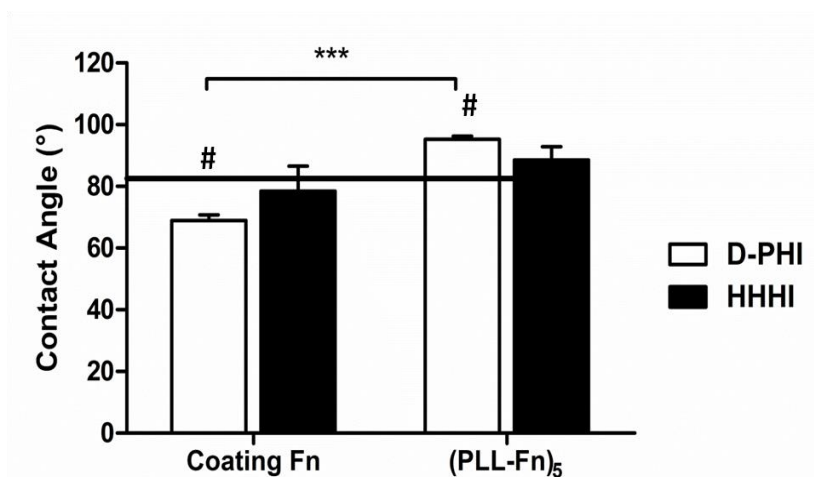


**Figure 2:** Quantification of Fn adsorption by BCA on D-PHI and HHHI surfaces studied with different coating protocols,  $n=4$  per experiment, repeated 3 times, mean  $\pm$  S.E., \*\*\* $p<0.01$ .

*The two conditions of each material are significantly different.*

Contact angle analysis was then performed to characterize the relative surface energetic nature of the two polyurethanes materials (**Figure 3**). The contact angle value for the as-cast materials was approximately 81.5° (e.g. approximate mid-point between 81.1±1.1 for D-PHI and 82.4±3.9 for HHHI). This is relatively typical of segmented polyurethanes in the literature, which report contact angle values that range from about 80-90° [48-50]. For the original D-PHI the introduction of a Fn-based coating led to significant changes for the observed contact angle values. A decrease in water contact angle to 68.9° is observed with a simple Fn layer deposition, whereas an increase to 95.3° was observed with the (PLL-Fn)<sub>5</sub> coating. Interestingly, the Fn single deposition or (PLL-Fn)<sub>5</sub> multilayer coatings on HHHI did

not significantly change the water contact angle ( $78.4^{\circ} \pm 8.2$  and  $88.5^{\circ} \pm 4.3$  respectively) relative to the as made HHHI sample ( $82.4^{\circ} \pm 3.9$ ), and yielded a much smaller change between each other than that observed for the original D-PHI and protein substrates. These findings imply that different structural presentations of Fn were being generated as a result of the interactions of Fn with the two different surfaces, which themselves present different anionic and hydrophobic character relative to their non-ionic polar nature.

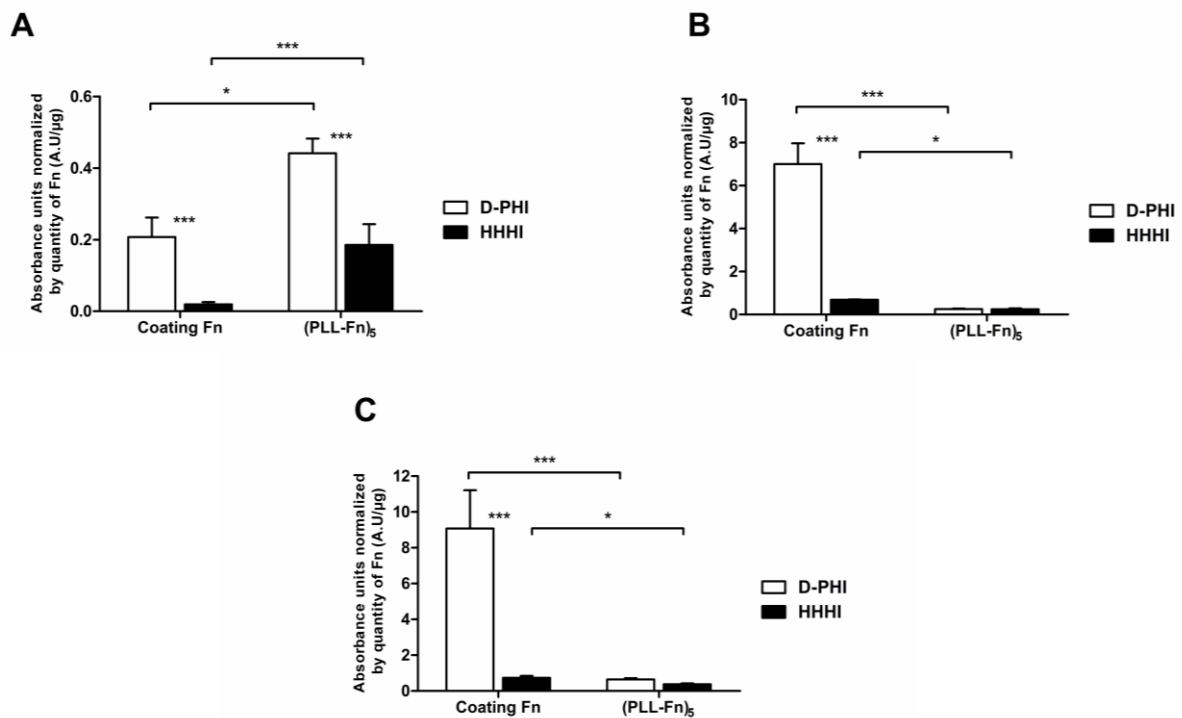


**Figure 3:** Water contact angle measurements for D-PHI and HHHI with different coatings.  $n=3$ , repeated 3 times, means  $\pm$  S.E. \*\*\* $p < 0.01$ , # $p < 0.01$  for D-PHI between No coating and Coating Fn or No coating and (PLL-Fn)<sub>5</sub>. The average contact angle values of the as-cast materials prior to protein coating is around  $81.5^{\circ}$  (e.g.  $81.1 \pm 1.1$  for D-PHI and  $82.4 \pm 3.9$  for HHHI) (represented by the line).

Given these observations, it was important to further consider the availability of peptides to be recognized by their paired antibodies. This would provide some information on structural presentation of the active peptide sequences on Fn, for the different coatings, and thereby assess the influence of material chemistry on Fn structure (**Figure 4**). Note that the **Supplementary Table S2** shows that the BSA control, which represents non-specific interactions, has an extremely low absorbance for the 3 different antibodies, implying that the reported values in **Figure 4** specifically represent epitopes that are detected on Fn. The availability of the N-Terminal sequences, normalized to the quantity of Fn, increased with the addition of the (PLL-Fn)<sub>5</sub> multilayer structures on the two polyurethanes, and hence a change in protein presentation to the antibody associated with peptides on the Fn with the introduction of the multilayer form was confirmed (**Figure 4.A**). The absorbance level and



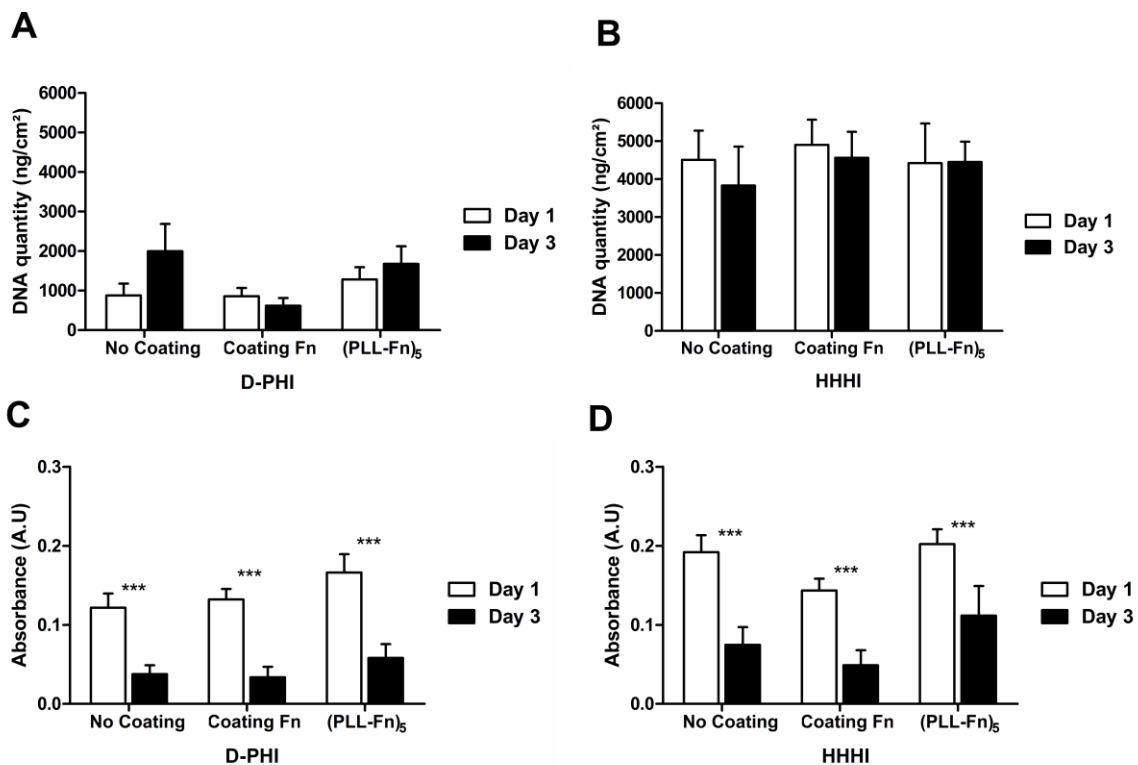
hence the number of active N-Terminals was different depending on the original substrate material used, indicating an influence of the material chemistry on the recognition of the peptide sequences by the Fn antibodies. Note that HHHI exposed the fewest number of antibodies recognized N-terminal sequences available for both monolayer and multilayers (irrespective of the fact that HHHI absorbed more protein in monolayer and the least amount of protein in multilayer). In contrast to the trend with the N-terminal binding, the availability of the C-Terminal and Cell Binding sequences with the addition of (PLL-Fn)<sub>5</sub> multilayers decreased on the two polyurethanes relative to the monolayer-Fn materials, demonstrating a change in anti-body recognized epitopes on the Fn structure, depending on whether it is adsorbed alone or in a multilayer (**Figure 4.B and 4.C**). Further emphasizing the influence of chemistry, that was observed in the case for N-terminal, HHHI exposed significantly fewer C-Terminal and Cell Binding sequences than did D-PHI for the Fn monolayer. However, in contrast to N-Terminal data, there were no differences between the two materials for the multilayer structures.



**Figure 4:** Availability of Fn peptide sequences measured by ELISA. Three monoclonal antibodies are used: A) N Terminal Domain, B) C Terminal Domain and C) Cell binding Domain (see Figure 1 for their location). The absorbance is normalized to the quantity of Fn adsorbed from the BCA assay. BSA was used as a control.  $n=4$  per experiment, repeated 3 times. Data represent the mean  $\pm$  S.E. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.01$ .

### 3.2 Study of monocyte behavior on Fn coated surfaces

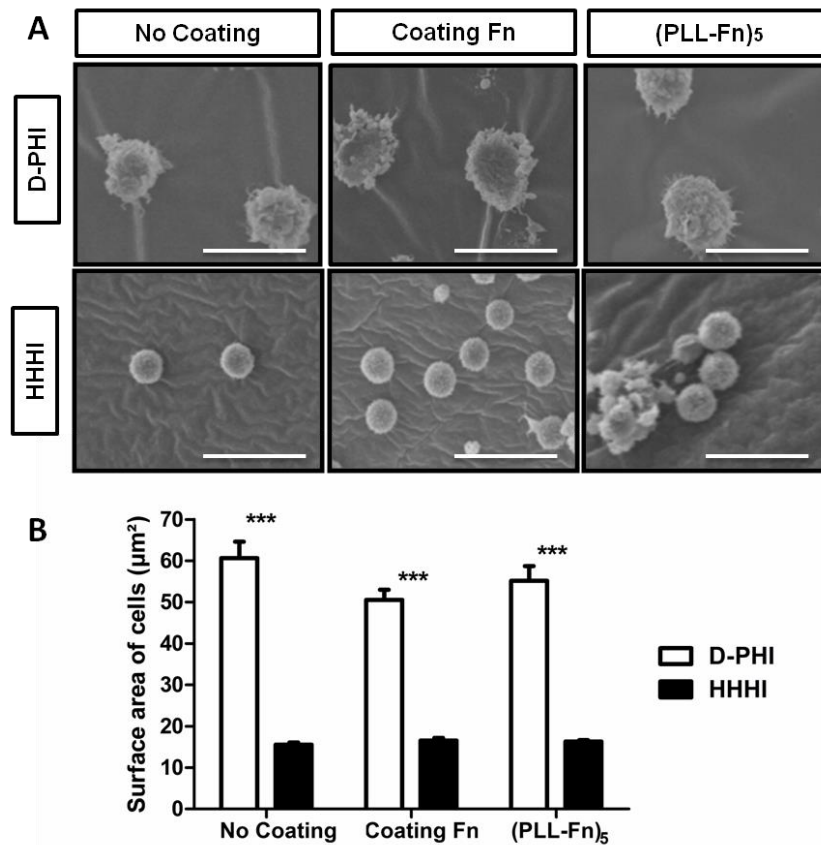
The behavior of human monocytes on the different surfaces was of particular interest because of the important wound healing/inflammation role that these cells play around implant sites where ECM and monocytes will interact with biomaterials. There was relatively very little difference in DNA levels associated with adhered cells between day 1 and 3 for D-PHI or HHHI (**Figures 5.A and 5.B**) when comparing the different protein coatings for a given material. However, the HHHI surface distinguished itself by showing statistically more DNA than D-PHI (approximately 2 times higher, e.g. ~ 2000 for D-PHI to ~ 4000 ng/cm<sup>2</sup> for HHHI), with or without Fn. The metabolic activity (**Figures 5.C and 5.D**) decreased for all materials and conditions, between days 1 and 3. The HHHI has many attached cells with a very low metabolic activity on day 3, which would imply a lower activated state of the cells. Note that the ratio metabolic activity/DNA quantity (**Supplementary Table S3**) also shows a decrease between day 1 and day 3 for both materials indicating that monocyte activation is reduced.



**Figure 5:** DNA mass quantification on A) D-PHI and B) HHHI with different coatings after 1 day and 3 days of incubation. Evaluation of metabolic activity using WST for C) D-PHI and D) HHHI with different coating conditions after 1 day and 3 days of incubation.  $n=3$  per experiment, repeated 3 times with 3 different blood donors. Data represent the mean  $\pm$  S.E.

\*\*\*  $p < 0.01$  between day 1 and day 3.

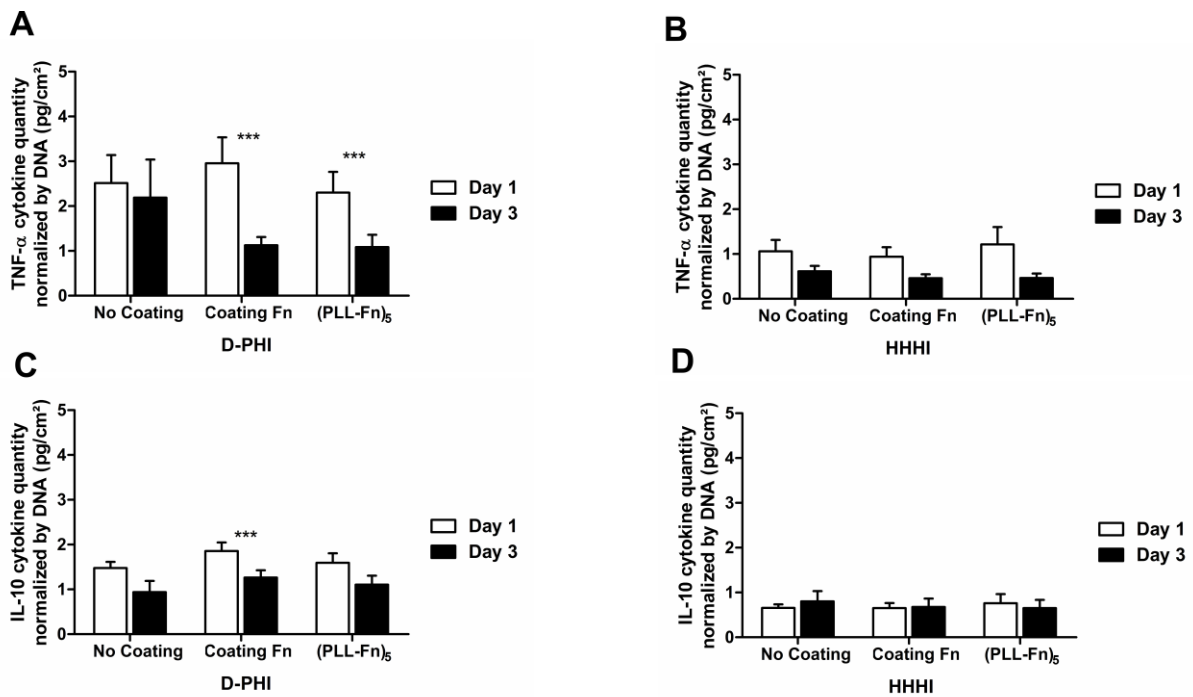
Given that cell morphology (cell size, cytoplasmic spreading and pseudopodia) has also been correlated with monocyte activation [51], then the latter was taken into consideration when evaluating the monocyte-biomaterial interactions. It was observed that on the HHHI surface with single Fn or multilayered Fn the monocytes had a smaller cell surface area (approximately  $0.05 \mu\text{m}^2$ ) and shorter pseudopodia extensions (**Figure 6.B**). In contrast the original D-PHI had more spread cells when compared to HHHI (**Figure 6.A**), with or without Fn. The HHHI surface enabled adhesion, although with less cell surface interaction area, and did not activate extensively (*i.e.* very round cells), with or without Fn. The monocytes on the original D-PHI have a significantly more elevated surface area when compared to the HHHI (D-PHI is 4 times higher, approximately  $0.2 \mu\text{m}^2$ ) (**Figure 6.B**).



**Figure 6:** A) Morphology of cells on D-PHI and HHHI surfaces with different coating conditions at 3 days of monocytes incubation, obtained by SEM. B) Measurement of surface area for monocytes on the two surfaces with different coatings at 3 days of incubation (SEM images).  $n=3$ , repeated 3 times with 3 different blood donors. Scale bars represent  $15\mu\text{m}$ .

\*\*\* $p < 0.01$

Another measure of monocyte activation can be assessed by cytokine release. TNF $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine and IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and both are typically released upon cell adhesion to biomaterials [52]. TNF $\alpha$  and IL-10 values were approximately 2 to 3 times higher on D-PHI than on HHHI, (Figures 7). For TNF $\alpha$ , the quantity is approximately 3 times higher on D-PHI when compared to HHHI (Figure 7.A and 7.B), while for IL-10 the levels are approximately 2 times greater for D-PHI (Figure 7.C and 7.B). Furthermore, while the introduction of Fn coatings did not appear to change the temporal cytokine profiles from that of native HHHI, the latter was not the case for D-PHI, as in both of the Fn states monitored for TNF $\alpha$  and in the Fn coating for IL-10 on D-PHI there were significant changes between days 1 and 3 for cytokine detection in the presence of protein coatings, but there were no differences for the native D-PHI material on its own for the two time points.



**Figure 7:** Quantification of the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  on A) D-PHI and B) HHHI with different coating conditions after 1 day and 3 days of incubation. Quantification of the anti-inflammatory cytokine IL-10 on C) D-PHI and D) HHHI with different coating conditions after 1 day and 3 days of incubation.  $n=3$ , repeated 3 times with 3 different blood donors. Data represent the mean  $\pm$  S.E. \*\*\*  $p < 0.01$  between day 1 and day 3.

In summary, it was observed that HHHI contributed to a lower activation state of cells and a low inflammatory phenotype in the presence of Fn coatings. To the contrary, the original D-PHI has cells with a more elevated activation state and showed stronger markers of inflammatory character than HHHI, and the introduction of Fn coatings did not appear to substantially alter those observations, although there were changes in temporal effects in the presence of Fn. The interactions with Fn in the two states (mono and multilayers) indicate that the substrate chemistry interacts quite differentially with their biological environment. The data as a whole show this to be true whether that interaction is protein or cellular in nature.

#### **4. Discussion**

When a medical device is implanted, the immune system typically recognizes it as a foreign body, enabling a significant recruitment of inflammatory cells including monocytes, neutrophils and lymphocytes. Monocytes are of particular importance for the long-term function of the biomaterial [46, 53]. Cell–protein interactions are believed to be important in directing the monocyte response to a biomaterial surface, where both the type of protein and its conformation upon adsorption to the biomaterial surface can be influenced by material chemistry [31]. There have been very few studies that have investigated the relation of material chemistry with respect to comparisons of mono vs multilayer protein structures with polyurethanes, and specifically none with immuno-modulatory materials such as the D-PHI structures. The multilayer structures are particularly attractive for their potential use as biomolecular reservoirs for inserting bioactive therapeutics [39].

The results of the current study show that important changes in the protein organization on the surfaces can occur with small variations in surface hydrophobicity and anionic content generated by the two polyurethanes, with HHHI showing a more tempered effect relative to this protein behavior when compared to the original D-PHI (**Figures 2-4**). Here, the simplistic relationships of hydrophobic/hydrophilic character give way to more complex biochemical/chemical arrangements. The surface changes would suggest that the heterogeneity in material chemistry appears to be a more critical element than that of the material's relative hydrophobicity. This is particularly observed in terms of inducing changes in the protein's presentation at the surface for the multilayer states. HHHI contains greater diversity in terms of polar non-ionic, anionic and hydrophobic character when compared to the original D-PHI, since it contains a more balanced contribution of anionic function relative to the other two groups. It has been shown that the nature and distribution of chemical groups on surfaces can induce changes in protein presentation [47]. In view of these results it is

therefore hypothesized that the polymer's heterogeneity (anionic, polar non-ionic and hydrophobic functional groups) plays a key role in the adsorption of Fn and could partially explain some of the protein and cellular activity.

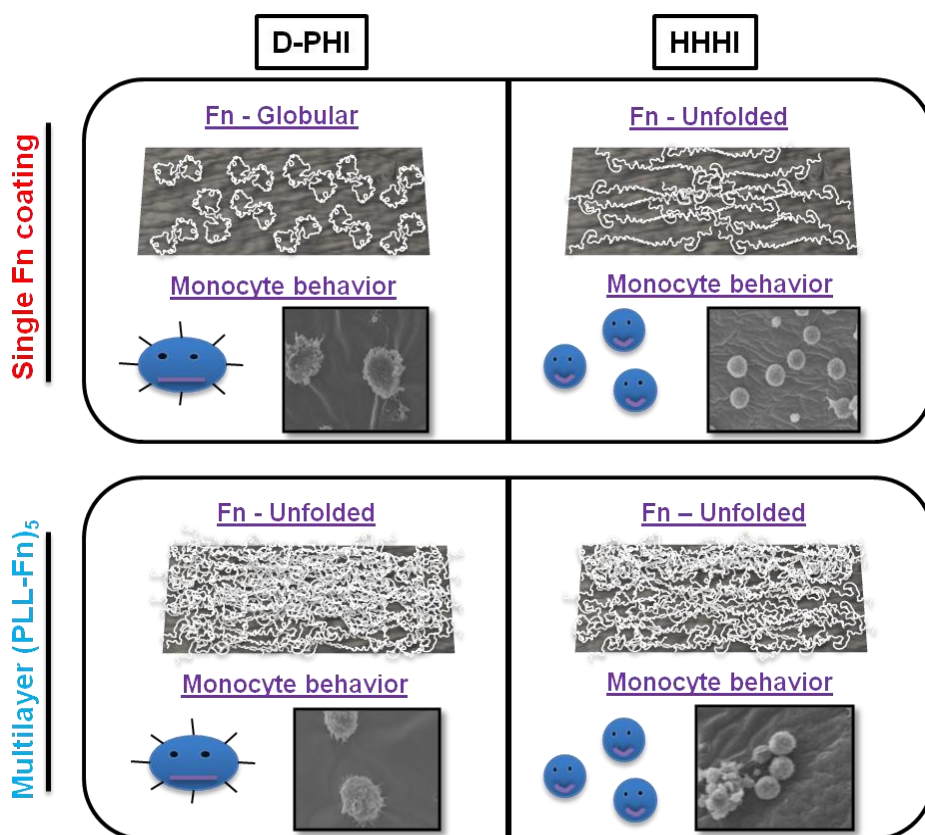
It is important to consider how subtle changes in material chemistry can influence the structure and function of these proteins. Upon adsorption to surfaces, Fn undergoes changes that affect its biological activity [54-58]. Previous studies have shown that the type, quantity, and conformation (activity) of adsorbed proteins are influenced by the underlying substrate, and specifically the surface's heterogeneity, roughness and inherent chemistry [54, 59-63]. Given that the two surfaces were both very smooth (*see Supplementary Figure S2*), and elemental analysis was similar (*Supplementary Table S1*), this leaves only surface chemical group heterogeneity to consider. Here, HHHI differentiates itself from the original D-PHI by consistently showing the lowest presentation of all three peptide sequences (**Figure 4**) whether in monolayer or multilayer form. Further, the observation that the presentation of peptide sequences was not the same in all instances for monolayer *vs* multilayer data emphasizes the importance of the protein's physical state. The contact angle data was an early indicator that protein interactions could be different, and as a result it was seen that the presentation of Fn to the antibodies was affected by the interaction of protein with the substrate. For instance, the relative change in hydrophobicity, post-protein adhesion in multilayer, differed significantly as a function of material chemistry (*e.g.* D-PHI's contact angle changed for the two protein states relative to non-protein coating, but HHHI was not significantly different for either protein state relative to its native surface, **Figure 3**).

A previous study showed that when Fn is present in small quantities, the conformation and orientation of the adsorbed Fn molecule promotes the exposure of the cell binding domain [57]. This is also what **Figure 4** shows in the presence of a single Fn coating. Note that HHHI, which adsorbed the most Fn in monolayer also had the least cell binding domain available. Conversely, D-PHI adsorbed the least Fn in monolayer, and made available a much greater number of cell binding sequences. Yet, HHHI is the surface that had the greatest number of adhered monocytes (**Figure 5.B**) while showing a very lightly activated state (**Figures 5.D and 6**). This observation requires an explanation and it is likely found in the observation that the size of the monocytes/macrophages were 4x larger on D-PHI than on HHHI, indicating that the cell surface area available to interact with the Fn binding domain was much greater than would be suggested by the DNA data. Note that monocyte/macrophage

spreading is a marker of activation [51], and hence the D-PHI substrates are much more activated relative to HHHI, and this transcends the Fn state, in mono or multilayer form.

Given that increased cell size, cytoplasmic spreading, and the presence of pseudopodia are activation markers for monocytes [51] then the larger the cells are, the more they are spread with a strong presence of pseudopodia, and the more they show the release of activated cytokines. Again here, when considering the relative differences in the chemical heterogeneity of the two polyurethanes and what was observed above for the effect of chemical changes on Fn interactions, it would appear that the distribution of surface charge and chemical function distribution may also be implicated in the observation with the monocytes. Previous studies have shown that the cell adhesion is not only determined by surface wettability, but is also affected by the surface functional group and its density, and is influenced by the conformation of the Fn adsorbed [64]. The cytokine data appears to accentuate the relationship with protein rearrangement for (PLL-Fn)<sub>5</sub> coatings as they show that TNF- $\alpha$  and IL-10 values are higher on D-PHI than on the HHHI. TNF- $\alpha$  is a pro-inflammatory cytokine and its generation by monocytes is another important indicator of monocyte activation because it is a potent inflammatory cytokine that can activate virtually all cells [65]. Note that it is only the original D-PHI material with Fn (e.g. the substrates showing the highest values in Fn related antibody activity) that displayed a significant temporal change in TNF- $\alpha$  activity relative to the non-protein coated D-PHI, which itself retained high TNF- $\alpha$  values and no significant temporal activity changes (Figure 7). HHHI on the other hand which showed low antibody activity, showed no change in temporal behavior between 1 and 3 days for TNF- $\alpha$  release.

All these results lead us to propose a schematic representation of structural arrangement and molecular organisation for single and multilayer Fn, and subsequent human monocyte behavior, on D-PHI and HHHI polyurethanes (**Figure 8**).



**Figure 8:** Schematic representation of structural arrangement and molecular organisation of single and multilayer Fn, and subsequent human monocyte behavior, on D-PHI and HHHI polyurethanes.

For the case of D-PHI a low amount of Fn adsorption (less than  $0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) (**Figure 2**) is observed in a monolayer coating. This is lower than what was previously observed for Fn adsorption on other substrates (*e.g.*  $\text{SiO}_2$ ) which has been estimated to  $0.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  [47]. Moreover, the size of Fn is about 120 nm length in an unfolded conformation with its globular domains being 2nm in diameter, versus 30 nm for the globular form. Therefore, to completely cover a surface of  $1 \text{ cm}^2$ , 0.3 to  $0.4 \mu\text{g}$  of Fn is needed if the protein is in this unfolded state, and more is required if the globular state exists. These considerations suggest that the D-PHI surface is not totally covered with Fn and that there is spacing between the globular Fn structures, even though the Fn is evenly distributed (*e.g.* the immunofluorescence results (**Supplementary Figure S3**) show qualitatively that the surface is covered homogeneously across the sample from a microscopic point of view). Moreover, in this latter case, the 3 sequences of Fn are readily available to the antibody markers (**Figure 4**) and presented in a manner that renders the surface more hydrophilic (**Figure 3**) as the water contact angle is



decreased. These results suggest that Fn has been kept in its native globular conformation or is partially unfolded for D-PHI (**Figure 8**). By adopting this arrangement, this allows accessibility of the CBD and C terminals sequences and show a slightly lower accessibility of the N terminals (**Figure 4**).

In contrast, with multilayers the model in **Figure 8** depicts that there is higher Fn adsorption and lower availability of the sequences per mass of total Fn, except for the N terminal, and hence the Fn appears to have adopted an increased unfolded conformation. In fact, a previous study showed that Fn within the (PLL-Fn)<sub>5</sub> film exhibits a change of conformation leading to the formation of intermolecular  $\beta$ -strands, suggesting interactions between Fn molecules in the form of aggregation [41]. This hypothetical model is further confirmed in part for D-PHI by the contact angle results which show a significant difference in contact angle between the mono and multilayer conditions, implying that a very different structural presentation of Fn was generated as a result of the interactions of D-PHI with Fn. Specifically, it is noted that for D-PHI, the contact angles values are significantly lower with the Fn coated surfaces (*i.e.*  $68.9^\circ \pm 1.8$ ) in comparison to its non-Fn surface ( $81.1^\circ \pm 1.1$ ).

For the case of the single Fn coating condition, a high amount of Fn adsorption onto the HHHI surface (**Figure 2**) was observed and in turn presented a relatively lower availability of the 3 different sequences to the antibodies used in the assays on Fn, in comparison to D-PHI (**Figure 4**). These results suggest that Fn molecules appear to have adopted a more unfolded conformation in contact with the HHHI surface, with a potential for early self-assembly of the sequences, as shown in **Figure 8**. In fact by adopting this unfolded conformation, the different Fn sequences are altered and therefore are least accessible to the antibodies. HHHI is a protein altering surface, probably influenced by the higher anionic and hydrophobic heterogeneity. These results also show that for the multilayer condition, there is an increase Fn adsorption (**Figure 2**) and always a low availability of CBD and N terminal sequences for the protein (**Figure 4**). Hence, Fn appears to be in an unfolded state. For HHHI, this hypothesis is confirmed in part from the contact angle results which show minimal change in values between the mono and multilayer conditions, e.g. almost no change with its non-Fn values (*e.g.*  $82.4^\circ \pm 3.9$ ). Hence, on the surface of the multilayer Fn coatings, it appears that the Fn is sometimes in a partially unfolded form because the results of the N terminal analysis (**Figure 4**) show a lower availability for HHHI than on D-PHI.

Note that in the multilayer condition, it was observed that all surfaces showed a higher availability of the N terminal domain for the multilayer vs Fn coatings. Therefore, Fn appears to interact with Fn and / or PLL in a manner that masks the C terminal sequences and cell binding domains (CBD), but not the N terminal (**Figure 8**). This could be explained by the overall charge of the different domains within Fn (**Figure 1.B**). The PLL is positively charged, such that it would interact with the CBD (III-9/10) having an overall charge of -2. The N terminal (I-1/2/3/4/5) having an overall charge of +2, would not favor interactions with the PLL. Likewise, the terminal C sequence (III-12/13/14/IIICS/15) with an overall charge of +2 may not be considered favored to interact with the PLL. However, upon closer examination of the C terminal region, domains III-12/13/14 have an overall charge of +10 while domains III-IIICS/15 have an overall charge of -8. It can be postulated that PLL may preferentially react with the latter of these two domains, and therefore the antibody may not recognize the entire sequence of the C terminal domain composed of the five sub-elements, despite the overall positive charge.

Previous studies have shown that plasma Fn can readily change shape in response to environmental conditions which, in turn, can lead to differential expression of its multiple functional sites [66]. Change in conformation or fragmentation of Fn is essential for the activation of monocytes via VLA-5 (on the RGD sequence) [24] and VLA-4 (on C terminal domain) (**Figure 8**) [26]. This may explain the results showing the low availability of the RGD cell binding sequence and C terminal domain, and hence the low activation state of monocytes for HHHI with mono or multilayer. In contrast, on the D-PHI surface, the results show that there is a greater availability of the RGD cell binding sequence and C terminal domain when looking at the monolayer of Fn, and the monocytes are more activated because there is a greater presence of pseudopodia (marker of inflammation). In addition, D-PHI but not HHHI, showed significantly higher cytokine release levels at day 1 vs day 3 for three of the four Fn surfaces, indicating a greater initial inflammatory state post interaction with Fn (**Figure 8**). Hence, the results are in agreement with the moderate activation of the monocytes, since the RGD sequence was available, allowing a partial monocyte activation.

These results show the importance of the intrinsic chemical heterogeneity of the material where, depending of diversity of the hydrophobic, ionic and polar character that make up the material, the behavior of Fn will vary and influence its presentation to the biological milieu.

## **5. Conclusion**

The results presented in this study show the importance of chemical heterogeneity associated with co-polymeric polyurethanes, linked to the intrinsic material chemistry, on protein chain structure and presentation to the biological environment, more specifically the change in antibody recognition of the Fn's peptide sequences, as well as how this parallels the activation of immune cells such as monocytes. The ability to generate stable thin films that retain low monocytic activity after introducing the Fn layers onto HHHI is of great interest for the development of future bio-functionalized substrates, because it suggests that it would be technically possible to introduce multi-polyelectrolyte layers on substrates like HHHI without modifying the intrinsic biological activation of innate immune cells. This offers the possibility of introducing into these multilayer films, therapeutic molecules and biomacromolecules which could allow one to further modulate the response and behavior of bioprocesses such as wound healing, hyper-proliferation, and coagulation, to name a few, while retaining the properties already acquired by the chemistry of the native biomaterial.

## **Acknowledgements:**

Natural Sciences and Engineering Research Council Synergy grant and ERRMECe (BioSan).

## **References:**

- [1] D. Ganten, Ruckpaul, Klaus (Eds.) *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, Springer, New York, 2006.
- [2] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, *Foreign body reaction to biomaterials*, *Semin Immunol* 20(2) (2008) 86-100.
- [3] S. Sharifpoor, R.S. Labow, J.P. Santerre, *Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications*, *Biomacromolecules* 10(10) (2009) 2729-39.
- [4] S.M. McDonald, L.A. Matheson, J.E. McBane, D. Kuraitis, E. Suuronen, J.P. Santerre, R.S. Labow, *Use of monocyte/endothelial cell co-cultures (in vitro) and a subcutaneous implant mouse model (in vivo) to evaluate a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane*, *J Cell Biochem* 112(12) (2011) 3762-72.
- [5] J.W. Cheung, D. Jain, C.A. McCulloch, J.P. Santerre, *Pro-angiogenic character of endothelial cells and gingival fibroblasts cocultures in perfused degradable polyurethane scaffolds*, *Tissue Eng Part A* 21(9-10) (2015) 1587-99.

- [6] K.G. Battiston, B. Ouyang, E. Honarparvar, J. Qian, R.S. Labow, C.A. Simmons, J.P. Santerre, Interaction of a block-co-polymeric biomaterial with immunoglobulin G modulates human monocytes towards a non-inflammatory phenotype, *Acta Biomater* 24 (2015) 35-43.
- [7] K.G. Battiston, R.S. Labow, J.P. Santerre, Protein binding mediation of biomaterial-dependent monocyte activation on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *Biomaterials* 33(33) (2012) 8316-28.
- [8] C.J. Wilson, R.E. Clegg, D.I. Leavesley, M.J. Percy, Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review, *Tissue Eng* 11(1-2) (2005) 1-18.
- [9] K.M. Lohr, C.A. Kurth, D.L. Xie, J.M. Seyer, G.A. Homandberg, The amino-terminal 29- and 72-Kd fragments of fibronectin mediate selective monocyte recruitment, *Blood* 76(10) (1990) 2117-24.
- [10] D.E. Doherty, P.M. Henson, R.A. Clark, Fibronectin fragments containing the RGDS cell-binding domain mediate monocyte migration into the rabbit lung. A potential mechanism for C5 fragment-induced monocyte lung accumulation, *J Clin Invest* 86(4) (1990) 1065-75.
- [11] R.A. Clark, N.E. Wikner, D.E. Doherty, D.A. Norris, Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment, *J Biol Chem* 263(24) (1988) 12115-23.
- [12] K. Yonemasu, A. Nakanishi, T. Sasaki, S. Kashiba, Stimulation of locomotion of peripheral blood monocytes by human plasma fibronectin, *Microbiol Immunol* 27(3) (1983) 283-90.
- [13] S. Patel, A.F. Chaffotte, B. Amana, F. Goubard, E. Pauthe, In vitro denaturation-renaturation of fibronectin. Formation of multimers disulfide-linked and shuffling of intramolecular disulfide bonds, *Int J Biochem Cell Biol* 38(9) (2006) 1547-60.
- [14] E. Pauthe, J. Pelta, S. Patel, D. Lairez, F. Goubard, Temperature-induced beta-aggregation of fibronectin in aqueous solution, *Biochim Biophys Acta* 1597(1) (2002) 12-21.
- [15] J. Pelta, H. Berry, G.C. Fadda, E. Pauthe, D. Lairez, Statistical conformation of human plasma fibronectin, *Biochemistry* 39(17) (2000) 5146-54.
- [16] R.O. Hynes, *Fibronectins*, New York, 1990.
- [17] R. Pankov, K.M. Yamada, Fibronectin at a glance, *J Cell Sci* 115(Pt 20) (2002) 3861-3.
- [18] E. Ruoslahti, M. Pierschbacher, E. Engvall, A. Oldberg, E.G. Hayman, Molecular and biological interactions of fibronectin, *J Invest Dermatol* 79 Suppl 1 (1982) 65s-68s.
- [19] K.J. Johnson, H. Sage, G. Briscoe, H.P. Erickson, The compact conformation of fibronectin is determined by intramolecular ionic interactions, *J Biol Chem* 274(22) (1999) 15473-9.
- [20] J.E. Schwarzbauer, J.L. Sechler, Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly, *Curr Opin Cell Biol* 11(5) (1999) 622-7.
- [21] J.L. Sechler, Y. Takada, J.E. Schwarzbauer, Altered rate of fibronectin matrix assembly by deletion of the first type III repeats, *J Cell Biol* 134(2) (1996) 573-83.

- [22] R.P. Grant, C. Spitzfaden, H. Altroff, I.D. Campbell, H.J. Mardon, Structural requirements for biological activity of the ninth and tenth FIII domains of human fibronectin, *J Biol Chem* 272(10) (1997) 6159-66.
- [23] P.R. Sudhakaran, A. Radhika, S.S. Jacob, Monocyte macrophage differentiation in vitro: Fibronectin-dependent upregulation of certain macrophage-specific activities, *Glycoconj J* 24(1) (2007) 49-55.
- [24] Y. Takada, C. Huang, M.E. Hemler, Fibronectin receptor structures in the VLA family of heterodimers, *Nature* 326(6113) (1987) 607-9.
- [25] M.J. Humphries, A. Komoriya, S.K. Akiyama, K. Olden, K.M. Yamada, Identification of two distinct regions of the type III connecting segment of human plasma fibronectin that promote cell type-specific adhesion, *J Biol Chem* 262(14) (1987) 6886-92.
- [26] A.P. Mould, A. Komoriya, K.M. Yamada, M.J. Humphries, The CS5 peptide is a second site in the III<sub>CS</sub> region of fibronectin recognized by the integrin alpha 4 beta 1. Inhibition of alpha 4 beta 1 function by RGD peptide homologues, *J Biol Chem* 266(6) (1991) 3579-85.
- [27] M. Leiss, K. Beckmann, A. Giros, M. Costell, R. Fassler, The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo, *Curr Opin Cell Biol* 20(5) (2008) 502-7.
- [28] M.E. Hemler, C. Huang, L. Schwarz, The VLA protein family. Characterization of five distinct cell surface heterodimers each with a common 130,000 molecular weight beta subunit, *J Biol Chem* 262(7) (1987) 3300-9.
- [29] M. Hindie, E. Camand, R. Agniel, F. Carreiras, E. Pauthe, P. Van Tassel, Effects of human fibronectin and human serum albumin sequential adsorption on preosteoblastic cell adhesion, *Biointerphases* 9(2) (2014) 029008.
- [30] L. Baugh, V. Vogel, Structural changes of fibronectin adsorbed to model surfaces probed by fluorescence resonance energy transfer, *J Biomed Mater Res A* 69(3) (2004) 525-34.
- [31] A.J. Campillo-Fernandez, R.E. Unger, K. Peters, S. Halstenberg, M. Santos, M. Salmeron Sanchez, J.M. Meseguer Duenas, M. Monleon Pradas, J.L. Gomez Ribelles, C.J. Kirkpatrick, Analysis of the biological response of endothelial and fibroblast cells cultured on synthetic scaffolds with various hydrophilic/hydrophobic ratios: influence of fibronectin adsorption and conformation, *Tissue Eng Part A* 15(6) (2009) 1331-41.
- [32] M. Shen, I. Garcia, R.V. Maier, T.A. Horbett, Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes, *J Biomed Mater Res A* 70(4) (2004) 533-41.
- [33] K. Ren, Y. Wang, J. Ji, Q. Lin, J. Shen, Construction and deconstruction of PLL/DNA multilayered films for DNA delivery: effect of ionic strength, *Colloids Surf B Biointerfaces* 46(2) (2005) 63-9.

- [34] C.R. Wittmer, J.A. Phelps, W.M. Saltzman, P.R. Van Tassel, Fibronectin terminated multilayer films: protein adsorption and cell attachment studies, *Biomaterials* 28(5) (2007) 851-60.
- [35] S. Ravi, J.M. Caves, A.W. Martinez, C.A. Haller, E.L. Chaikof, Incorporation of fibronectin to enhance cytocompatibility in multilayer elastin-like protein scaffolds for tissue engineering, *J Biomed Mater Res A* 101(7) (2013) 1915-25.
- [36] S. Mauquoy, C. Dupont-Gillain, Combination of collagen and fibronectin to design biomimetic interfaces: Do these proteins form layer-by-layer assemblies?, *Colloids Surf B Biointerfaces* 147 (2016) 54-64.
- [37] A.K. Lvov, Y. Ichinose, I., Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption, *Journal of the American Chemical Society* (1995).
- [38] L.J. Chen, X. Liu, M., Layer-by-layer assembly of DNA-dye complex films, *Thin Solid Films* (2002).
- [39] A. Gand, M. Hindie, D. Chacon, P.R. Van Tassel, E. Pauthe, Nanotemplated polyelectrolyte films as porous biomolecular delivery systems. Application to the growth factor BMP-2, *Biomatter* 4 (2014) e28823.
- [40] C. Picart, Polyelectrolyte multilayer films: from physico-chemical properties to the control of cellular processes, *Curr Med Chem* 15(7) (2008) 685-97.
- [41] A. Gand, M. Tabuteau, C. Chat, G. Ladam, H. Atmani, P.R. Van Tassel, E. Pauthe, Fibronectin-based multilayer thin films, *Colloids Surf B Biointerfaces* 156 (2017) 313-319.
- [42] L. Poulouin, O. Gallet, M. Rouahi, J.M. Imhoff, Plasma fibronectin: three steps to purification and stability, *Protein Expr Purif* 17(1) (1999) 146-52.
- [43] R.O. Hynes, K.M. Yamada, Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins, *J Cell Biol* 95(2 Pt 1) (1982) 369-77.
- [44] H. Knopf-Marques, S. Singh, S.S. Htwe, L. Wolfova, R. Buffa, J. Bacharouche, G. Francius, J.C. Voegel, P. Schaaf, A.M. Ghaemmaghami, N.E. Vrana, P. Lavalle, Immunomodulation with Self-Crosslinked Polyelectrolyte Multilayer-Based Coatings, *Biomacromolecules* 17(6) (2016) 2189-98.
- [45] B.L. Strand, T.L. Ryan, P. In't Veld, B. Kulseng, A.M. Rokstad, G. Skjak-Brek, T. Espevik, Poly-L-Lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines, *Cell Transplant* 10(3) (2001) 263-75.
- [46] J.E. McBane, L.A. Matheson, S. Sharifpoor, J.P. Santerre, R.S. Labow, Effect of polyurethane chemistry and protein coating on monocyte differentiation towards a wound healing phenotype macrophage, *Biomaterials* 30(29) (2009) 5497-504.
- [47] L. Baujard-Lamotte, S. Noinville, F. Goubard, P. Marque, E. Pauthe, Kinetics of conformational changes of fibronectin adsorbed onto model surfaces, *Colloids Surf B Biointerfaces* 63(1) (2008) 129-37.

- [48] K. Domansky, D.C. Leslie, J. McKinney, J.P. Fraser, J.D. Sliz, T. Hamkins-Indik, G.A. Hamilton, A. Bahinski, D.E. Ingber, Clear castable polyurethane elastomer for fabrication of microfluidic devices, *Lab Chip* 13(19) (2013) 3956-64.
- [49] Z. Sheikh, A.S. Khan, N. Roohpour, M. Glogauer, I.U. Rehman, Protein adsorption capability on polyurethane and modified-polyurethane membrane for periodontal guided tissue regeneration applications, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 68 (2016) 267-75.
- [50] D. Paul, S. Paul, N. Roohpour, M. Wilks, P. Vadgama, Antimicrobial, mechanical and thermal studies of silver particle-loaded polyurethane, *J Funct Biomater* 4(4) (2013) 358-75.
- [51] F. Boccafoschi, C. Mosca, M. Ramella, I. Carmagnola, V. Chiono, G. Ciardelli, M. Cannas, Biological evaluation of materials for cardiovascular application: the role of the short-term inflammatory response in endothelial regeneration, *J Biomed Mater Res A* 101(11) (2013) 3131-40.
- [52] D.M. Mosser, The many faces of macrophage activation, *J Leukoc Biol* 73(2) (2003) 209-12.
- [53] B.N. Brown, R. Londono, S. Tottey, L. Zhang, K.A. Kukla, M.T. Wolf, K.A. Daly, J.E. Reing, S.F. Badylak, Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials, *Acta Biomater* 8(3) (2012) 978-87.
- [54] F. Grinnell, M.K. Feld, Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity, *J Biomed Mater Res* 15(3) (1981) 363-81.
- [55] D.J. Iuliano, S.S. Saavedra, G.A. Truskey, Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength of adhesion, *J Biomed Mater Res* 27(8) (1993) 1103-13.
- [56] P.A. Underwood, J.G. Steele, B.A. Dalton, Effects of polystyrene surface chemistry on the biological activity of solid phase fibronectin and vitronectin, analysed with monoclonal antibodies, *J Cell Sci* 104 ( Pt 3) (1993) 793-803.
- [57] D.K. Pettit, A.S. Hoffman, T.A. Horbett, Correlation between corneal epithelial cell outgrowth and monoclonal antibody binding to the cell binding domain of adsorbed fibronectin, *J Biomed Mater Res* 28(6) (1994) 685-91.
- [58] A.J. Garcia, P. Ducheyne, D. Boettiger, Effect of surface reaction stage on fibronectin-mediated adhesion of osteoblast-like cells to bioactive glass, *J Biomed Mater Res* 40(1) (1998) 48-56.
- [59] K.L. Prime, G.M. Whitesides, Self-assembled organic monolayers: model systems for studying adsorption of proteins at surfaces, *Science* 252(5009) (1991) 1164-7.
- [60] V.A. Tegoulia, S.L. Cooper, Leukocyte adhesion on model surfaces under flow: effects of surface chemistry, protein adsorption, and shear rate, *J Biomed Mater Res* 50(3) (2000) 291-301.

- [61] K. Lewandowska, E. Pergament, C.N. Sukenik, L.A. Culp, Cell-type-specific adhesion mechanisms mediated by fibronectin adsorbed to chemically derivatized substrata, *J Biomed Mater Res* 26(10) (1992) 1343-63.
- [62] J.Y. Martin, Z. Schwartz, T.W. Hummert, D.M. Schraub, J. Simpson, J. Lankford, Jr., D.D. Dean, D.L. Cochran, B.D. Boyan, Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation, and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63), *J Biomed Mater Res* 29(3) (1995) 389-401.
- [63] C.H. Thomas, C.D. McFarland, M.L. Jenkins, A. Reznia, J.G. Steele, K.E. Healy, The role of vitronectin in the attachment and spatial distribution of bone-derived cells on materials with patterned surface chemistry, *J Biomed Mater Res* 37(1) (1997) 81-93.
- [64] F. Grinnell, M.K. Feld, Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium, *J Biol Chem* 257(9) (1982) 4888-93.
- [65] J. Vilcek, T.H. Lee, Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions, *J Biol Chem* 266(12) (1991) 7313-6.
- [66] T.P. Ugarova, C. Zamarron, Y. Veklich, R.D. Bowditch, M.H. Ginsberg, J.W. Weisel, E.F. Plow, Conformational transitions in the cell binding domain of fibronectin, *Biochemistry* 34(13) (1995) 4457-66.
- [67] I. Wierzbicka-Patynowski, J.E. Schwarzbauer, The ins and outs of fibronectin matrix assembly, *J Cell Sci* 116(Pt 16) (2003) 3269-76.
- [68] P. Singh, C. Carraher, J.E. Schwarzbauer, Assembly of fibronectin extracellular matrix, *Annu Rev Cell Dev Biol* 26 (2010) 397-419.



**Supplementary Figures:**

Surfaces	D-PHI (original)	HHHI (High Hydrophobic. High Ionic)
Atomic composition (%)		
Carbon	66.8 ± 2.1	67.7 ± 0.8
Oxygen	29.8 ± 1.3	29.3 ± 0.6
Nitrogen	3.3 ± 0.8	3.0 ± 0.2

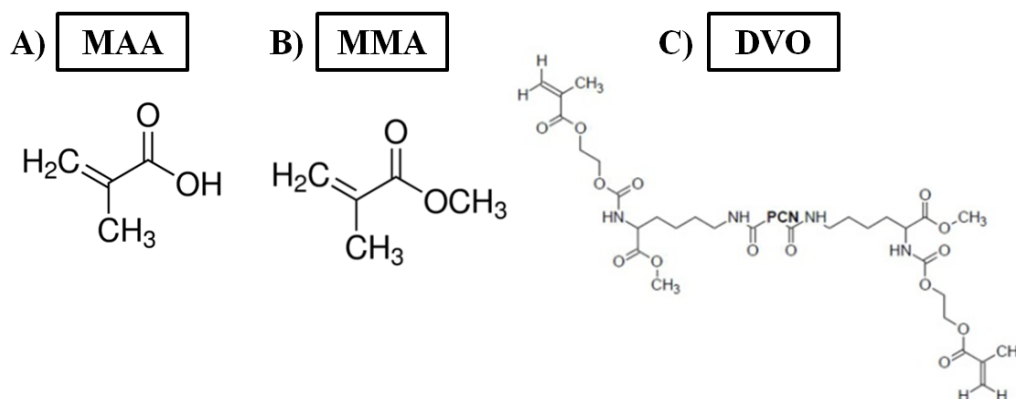
**Supplementary Table S1:** Energy dispersive X-ray spectrometry (EDS) show the atomic composition of the D-PHI and HHHI surfaces. n=3, repeated 3 times, 5 different spot per sample.

Sequences (A.U/cm <sup>2</sup> )		Cell Binding Domain	C terminal Domain	N terminal Domain
D-PHI	Coating Fn	0.22 ± 0.05	0.07 ± 0.05	0.18 ± 0.02
	(PLL-Fn) <sub>5</sub>	0.79 ± 0.08	0.54 ± 0.05	0.33 ± 0.03
	Coating BSA	0.024 ± 0.002	0.01 ± 0.001	0.032 ± 0.004
HHHI	Coating Fn	0.14 ± 0.02	0.01 ± 0.001	0.14 ± 0.004
	(PLL-Fn) <sub>5</sub>	0.24 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.17 ± 0.02
	Coating BSA	0.015 ± 0.001	0.009 ± 0.001	0.025 ± 0.002

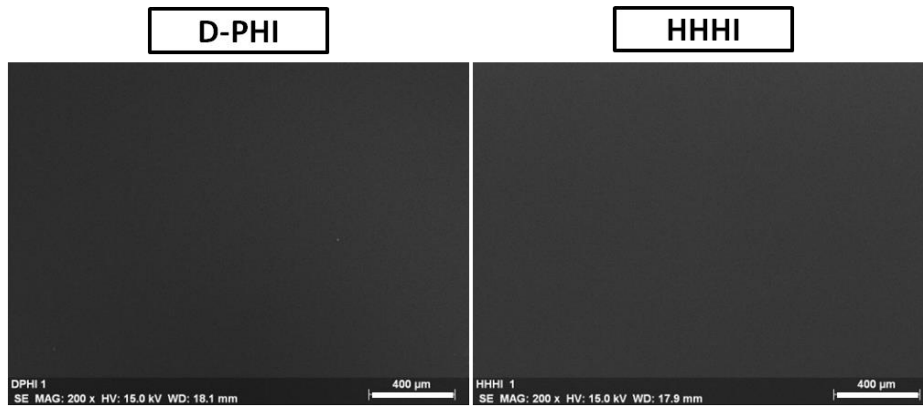
**Supplementary Table S2:** Availability of Fn peptide sequences measured by ELISA. Three monoclonal antibodies are used: A) N Terminal Domain, B) C Terminal Domain and C) Cell binding Domain (see Figure 1 for their location). BSA was used as a control. n=4 per experiment, repeated 3 times. Data represent the mean ± S.E. \* p<0.05, \*\*\* p<0.01.

Surfaces Conditions	D-PHI (original formulation)		HHHI (High Hydrophobic. High Ionic)	
	Day 1	Day 3	Day 1	Day 3
No coating	$140. 10^{-6} \pm 58. 10^{-6}$	$18. 10^{-6} \pm 7. 10^{-6}$	$47. 10^{-6} \pm 7. 10^{-6}$	$12. 10^{-6} \pm 18. 10^{-6}$
Coating Fn	$153. 10^{-6} \pm 63. 10^{-6}$	$56. 10^{-6} \pm 19. 10^{-6}$	$31. 10^{-6} \pm 3. 10^{-6}$	$17. 10^{-6} \pm 7. 10^{-6}$
(PLL-Fn) <sub>5</sub>	$129. 10^{-6} \pm 34. 10^{-6}$	$35. 10^{-6} \pm 10. 10^{-6}$	$70. 10^{-6} \pm 19. 10^{-6}$	$29. 10^{-6} \pm 11. 10^{-6}$

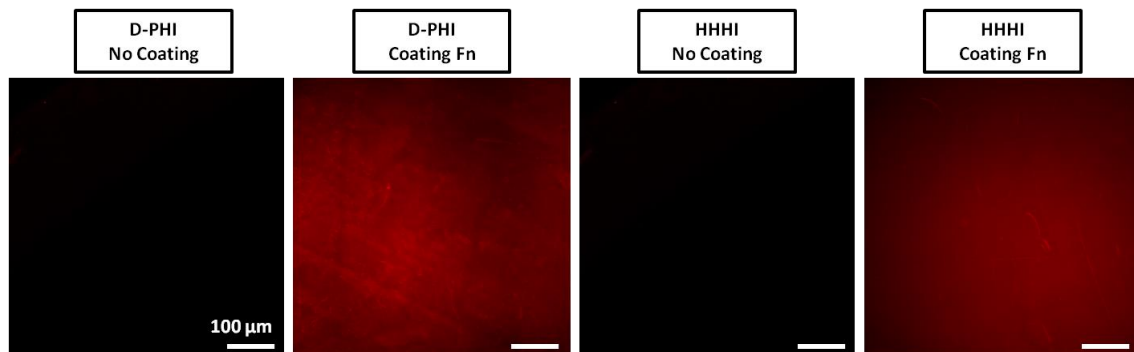
**Supplementary Table S3:** ratio of metabolic activity vs DNA quantity on the D-PHI and HHHI with different conditions and 2 times of incubations.



**Supplementary Figure S1:** Schematic representation of the polyurethane's monomers A) methacrylic acid (MAA) with its pendent carboxylic acid group which provides the polymer with the anionic content. B) methyl methacrylate (MMA) with its pendent methyl group which provides hydrophobic character and B) divinyl oligomer (DVO) with its carbonates and urethanes which provide non-ionic polar character.



**Supplementary Figure S2:** Scanning Electronic Microscopy (SEM) images represent the surface without coating of the two materials D-PHI (left) and HHHI (right).  $n=3$ , repeated 3 times. Scale bars represent 400 μm.



**Supplementary Figure S3:** Confocal laser scanning microscopy images (CLSM) represent the D-PHI or HHHI surface with or without Fn coating. Fn was fluorescently labeled with Alexa Fluor 568. The image shows full surface coverage.  $n=3$ , repeated 3 times. Scale bars represent 100 μm.

### **Conclusion**

Les résultats présentés dans cette étude montrent l'importance de l'hétérogénéité chimique associée aux polyuréthanes copolymères et plus particulièrement, l'influence de la chimie intrinsèque des polyuréthanes sur l'adsorption, la disponibilité de séquences spécifiques de la Fn et l'activation des cellules immunitaires que sont les monocytes. La possibilité de générer des multicouches à la surface du polyuréthane tout en conservant une faible activité monocyttaire présente un grand intérêt pour le développement de futurs matériaux bio-fonctionnalisés. Cela offre la possibilité d'introduire dans ces films multicouches des molécules thérapeutiques qui pourraient permettre de moduler davantage la réponse cellulaire et les processus tels que la coagulation, l'inflammation et la cicatrisation des plaies, tout en conservant les propriétés existantes acquises par la chimie du biomatériau d'origine.

Cette étude a montré que les matériaux O-D-PHI et HHHI présentaient des propriétés intéressantes en diminuant l'activation des monocytes. L'idée a donc été d'utiliser ces polyuréthanes, non plus comme matériaux autosupportés, mais comme matériaux de recouvrement pour des surfaces de cobalt chrome, alliage métallique utilisé dans la fabrication des stents, afin d'améliorer leur hémocompatibilité.

## II. Article 2

### **Coating of cobalt chrome substrates with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: characterization and interaction with human immunoglobulin G and fibronectin**

**Audrey Gossart<sup>a,b,c</sup>, Adeline Gand<sup>b</sup>, Véronique Ollivier<sup>a</sup>, Michel Boissière<sup>b</sup>, J Paul Santerre<sup>c</sup>, Didier Letourneur<sup>a</sup> and Emmanuel Pauthe<sup>b\*</sup>**

<sup>a</sup> *Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Inserm U1148, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris Cedex 18, France*

<sup>b</sup> *Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules (ERRMECe), Institut des Matériaux, Maison International de la Recherche, Université de Cergy-Pontoise, 95000 Neuville sur Oise, France*

<sup>c</sup> *Translational Biology and Engineering Program, Ted Rodgers Centre for Heart Research, Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering (IBBME) and the Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada*

\* Corresponding author: Pr Emmanuel Pauthe: Department of biology, University of Cergy Pontoise, International House of Research, 1 Rue Descartes 95000 Neuville sur Oise, France, Phone : +33 1 34 25 66 01, email : [Emmanuel.pauthe@u-cergy.fr](mailto:Emmanuel.pauthe@u-cergy.fr)

#### **Keywords**

Thin film surfaces, Polyurethane, Cobalt Chrome, Immunoglobulin G, Fibronectin.

This work has been published in the journal: **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, **Volume 179, 18<sup>th</sup> March 2019, Pages 114-120**

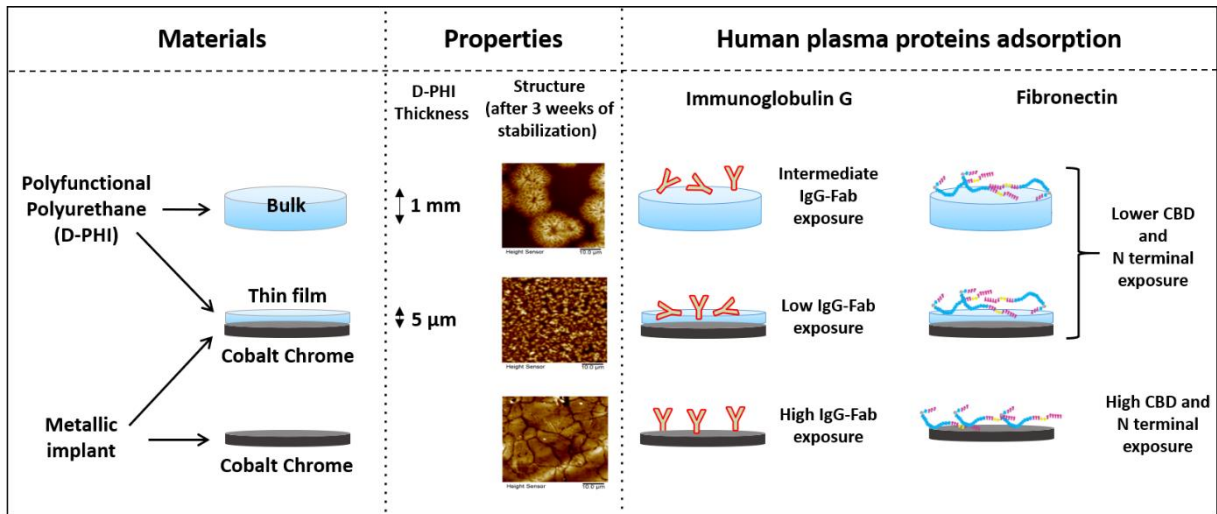
### Résumé

L'implantation de biomatériaux, en particulier métalliques, entraîne des réactions tissulaires spécifiques susceptibles de compromettre leur bio-intégration et/ou des interactions cellulaires optimales. Afin de minimiser ces réactions biologiques indésirables, les surfaces de ces biomatériaux peuvent être recouvertes de polymères tels que les polyuréthanes. Les polyuréthanes sont particulièrement intéressants car ils présentent une biocompatibilité supérieure aux substrats métalliques, sont d'une grande diversité chimique et possèdent des propriétés mécaniques ajustables. Le cobalt chrome est un alliage métallique largement utilisé pour la conception de biomatériaux, notamment pour des applications dans le domaine cardiovasculaire. Il présente de nombreux avantages (non magnétique, résistant à l'usure, à la corrosion et à la chaleur ...) mais il est également pro-thrombotique et pro-inflammatoire, d'où la nécessité d'améliorer la biocompatibilité de ce support.

L'objectif de ces travaux était de générer des films minces de polyuréthanes (D-PHI) sur des surfaces de cobalt chrome (CoCr). Deux formulations de D-PHI ont été testées : le matériau d'origine (O-D-PHI) et une formulation contenant des caractères hydrophobe et ionique plus élevés (HHHI). Les polyuréthanes ont été dilués dans du tétrahydrofurane (THF, solvant) pour générer des films minces et ont été comparés aux matériaux de base (épais). L'utilisation du solvant THF a permis de générer des films minces de quelques micromètres recouvrant l'ensemble de la surface de CoCr de manière homogène. Les résultats ont montré que le solvant influençait les propriétés physiques et chimiques des revêtements D-PHI. En effet, les résultats obtenus par spectrométrie dispersive X-ray (EDS) montrent que la composition atomique de surface est légèrement mais significativement modifiée tout comme l'angle de contact. De plus, les images obtenues par microscopie à force atomique (AFM) montrent l'apparition progressive de domaines présentant des organisations cristallines dont la forme et la taille dépendent de l'épaisseur du polyuréthane (films minces par rapport aux matériaux épais), l'apparition de ces cristaux étant plus rapide sur les films minces. La calorimétrie différentielle à balayage (DSC) et l'AFM ont permis de montrer que cette structuration est due à la cristallisation du monomère de Divinyl Oligomère (DVO). Après trois semaines, une stabilisation complète de l'état cristallin a été observée ainsi qu'une stabilité dans un environnement aqueux et à 37 ° C sur toutes les surfaces. L'adsorption de deux protéines plasmatiques humaines, l'immunoglobuline G (IgG) et la fibronectine (Fn), impliquées dans les processus d'inflammation et de coagulation, a ensuite été étudiée sur les films minces et les matériaux épais de polyuréthane. L'exposition du segment Fab de l'IgG est connue pour

favoriser l'adhésion et l'étalement des monocytes. Le Cell Binding Domain de la Fn, contenant la séquence RGD, active les monocytes et favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et le domaine N terminal contribue à la réticulation du caillot de fibrine ce qui favorise une augmentation de la taille du thrombus et l'adhésion plaquettaire. L'exposition de séquences protéiques spécifiques (Fab-IgG et Cell Binding Domain / domaine N terminal de la Fn) a été fortement réduite sur les deux matériaux D-PHI, quelle que soit l'épaisseur, par rapport au CoCr. Lorsqu'on compare les polyuréthanes entre eux, l'exposition du segment Fab de l'IgG et du domaine N Terminal de la Fn est influencée par la topographie de surface des matériaux et non par la formulation. En revanche, la disponibilité du CBD de la Fn est influencée par la chimie intrinsèque des matériaux. Ces résultats sont d'un grand intérêt pour recouvrir des substrats métalliques afin d'améliorer la réactivité des cellules immunitaires et éviter l'activation de la coagulation.

**Graphical Abstract**





## **Abstract**

Biomaterial implants often lead to specific tissue reactions that could compromise their bio-integration and/or optimal cellular interactions. Polyurethanes (PU) are of particular interest as coatings to mask CoCr's bioactivity, since they are generally more biocompatible than metal substrates, present a broad range of chemistry, and have highly tunable-mechanical properties. In the current work, complex polyvinyl-urethanes (referred to as D-PHI materials) are studied for their surface phase structures: specifically, an original D-PHI polymer (O-D-PHI) and a differential formulation with relatively higher hydrophobic and ionic content (HHHI) are of interest. The PUs are diluted in tetrahydrofuran (THF) to generate thin films which differentially influence the physical and chemical properties of the D-PHI coatings. AFM images over time show the gradual appearance of domains exhibiting crystalline organisation, and whose shape and size were dependent on D-PHI thickness (thin films vs non-solvent cast resin materials). After three weeks, a complete stabilization of the crystal state is observed. The thin coatings are stable in an aqueous and 37°C environment. The adsorption of two human plasmatic proteins Immunoglobulin G (IgG) and Fibronectin (Fn), involved in inflammation and coagulation, was studied. The exposure of specific protein sequences (IgG-Fab, Fn-Cell Binding Domain and Fn-N-terminal domain) were dramatically reduced on both D-PHI materials when compared to bare metal CoCr. The implications of these findings would be relevant to defining coating strategies used to improve the blood clotting and immune cell reactivity to CoCr implant materials.

## **Introduction**

Medical devices are clinically used in a wide range of applications and their performance is highly dependent on the nature of their surfaces and the latter's interaction

with defined proteins and cells. Post implantation of any biomaterial, a tissue reaction occurs which results in an inflammatory response driven, in large part, by immune related proteins and cell contact activation. An appropriately modulated innate immune response would improve the acceptance of a given biomaterial by the host and its bio-integration with tissues. Polyurethanes (PU) are attractive polymers for the biomedical industry<sup>1,2</sup>, as they present a broad range of chemistry, and their inherent chemical characteristics yields tailored mechanical properties. This in turn may enable enhanced biocompatibility, when the polymers are synthesized with defined compositions and microdomain features.

Recent work has focused on the synthesis of advanced-urethane vinyl based systems and their properties for reducing inflammatory responses by human blood monocytes<sup>3,4</sup>. These polyfunctional polyurethanes (referred to as D-PHI, or degradable polar/hydrophobic/ionic) contain in their original formula, a divinyl polycarbonate-lysine urethane oligomer –DVO-, methacrylic acid –MAA- and methyl methacrylate –MMA- (**Supplementary Figure S1**). The original D-PHI (O-D-PHI) had a molar ratio of 1:5:15, respectively, with DVO representing a polar non-ionic unit, MAA yielding anionic character, and MMA providing hydrophobic character. O-D-PHI has been shown to be biocompatible and non-toxic to cells when used in the engineering of vascular tissues with vascular smooth muscle cells (VSMCs)<sup>5</sup>, endothelial cells<sup>6</sup> and fibroblasts<sup>7</sup>. Furthermore, O-D-PHI has been shown to reduce the pro-inflammatory activation of monocytes when compared to tissue culture polystyrene (TCPS) and polylactic glycolic acid (PLGA)<sup>4,8</sup>, two prominent biomaterials reported on in the literature.

The block structure chemistry of D-PHI can be tuned by varying the hydrophobic and anionic monomer content relative to the polar divinyl oligomer content in order to obtain formulations that interact with human monocytes differentially. For example, an alternate

DVO/MAA/MMA ratio of 1:20:39 (referred to as HHHI, high hydrophobic and high ionic) appears to promote a further reduced inflammatory response by human blood monocytes relative to that of O-D-PHI with a 1:5:15 ratio<sup>3,8</sup>.

The combination of polar, hydrophobic and ionic character presents an opportunity to display diverse chemical group presentation, within different micro-domains, at material surfaces when exposed to unique environments, such as protein solutions. Such chemical group diversity is not unlike that which is also exhibited by different peptide residues found in proteins. Previous research showed that O-D-PHI's unique chemical structure enables one to direct specific binding sites and their respective exposure states for adsorbed immunoglobulin G (IgG)<sup>8</sup> and human plasma-derived fibronectin (Fn)<sup>3</sup>. The latter are important modulators of cellular responses, and specifically to those of monocytes. Immediately after implantation, when blood comes into contact with any biomaterial, there is a spontaneous protein adsorption on the surface<sup>9</sup>, before the interaction of the biomaterial with inflammatory cells. Therefore, the type, concentration, and conformational arrangement of the adsorbed proteins influence the recruitment and activation of immune cells<sup>9,10</sup>. The monocyte / macrophage interaction with a surface has been shown to depend on a defined number of plasma proteins, including IgG<sup>11</sup> and Fn<sup>12</sup>.

IgG is the most widespread immunoglobulin in extracellular fluids. Fragment antigen binding (Fab) enhances long-term macrophage adhesion<sup>8,13</sup> and their exposure at the biomaterial/protein interface influences the activation of immune cells, more particularly monocytes and macrophages.

Fn is an extracellular matrix glycoprotein and exists as a compact soluble form within plasma. It is composed of three types of repetitive modules (I, II and III), which contain binding domains to a wide range of extracellular and cellular surface molecules such as the

Cell Binding Domain (CBD) and N Terminal domain<sup>14</sup> previously shown to play a role in inflammation<sup>15,16</sup> and coagulation<sup>17,18</sup> respectively.

Cobalt chrome (CoCr) has been used as an implant biomaterial because of its physico/chemical properties and is common in cardiovascular medical devices such as, stents, heart valves and pacemakers. It is non-magnetic, resistant to wear, corrosion and heat and is considered by many literature studies to be biocompatible<sup>19,20</sup>, although there is some controversy related to this material. Previous studies have shown that bare CoCr is pro-thrombotic and pro-inflammatory due to its ability to activate platelets and coagulation proteins; and to induce leukocyte adhesion and activation<sup>21,22</sup>. Therefore, it would be of interest to improve the surface properties of CoCr.

The goal of this study was to investigate the potential use of thin film D-PHI materials for coating CoCr surfaces which come in contact with the innate immune cells. This is of significant importance as D-PHI has never been characterized in a thin film form. Specifically, there would be concern if D-PHI's critical anti-inflammatory nature was lost. The absence of this knowledge is vital to the premise that coating reactive CoCr materials will yield low inflammatory character<sup>5,8</sup>. Moreover, there are no reports in the polyurethane literature which describe the multiphase structure characterization of a dual phase polymer with vinyl chemistry combined with step growth chemistry. Despite the dominant effect of cobalt chrome chemistry on proteins, it has never been conceived to use complex polyurethanes in thin film form to alter the reactivity of cobalt chrome.

Hence, it was essential to characterize these thin films and their interaction with CoCr in order to better understand the structure and molecular organization of D-PHI in contact with CoCr. We thus focus on the physico-chemical surface characterization of the D-PHI coatings on CoCr and the subsequent IgG and Fn, behavior on these surfaces.

## **Materials and Methods**

### **Cobalt Chrome surface**

CoCr surfaces (L605, Goodfellow) were electropolished and the specimens designed to fit into the wells of 96-well plates (6 mm diameter, 0.25 mm thickness). CoCr surfaces were cleaned with pure water for 1 h, and then immersed in TFD 9-10 (detergent) for 2 h. Finally, the surfaces were washed in 70% ethanol for 2 h, sonicated in water (3 times during 10 min) and autoclaved.

### **Polyurethanes resins**

D-PHI synthesis was carried out using a previously established method<sup>5</sup>. Divinyl oligomer (DVO) were mixed with a methacrylic acid (MAA) and methyl methacrylate (MMA) mixture and added to the initiator benzoyl peroxide (BPO, 0.032 mol/mol vinyl group) to generate the polyurethane precursor solutions (**Supplementary Figure S1**). Respectively for DVO/MAA/MMA, the resin formulation referred to as original D-PHI (O-D-PHI) had a 1: 5: 15 stoichiometry, whereas HHHI (High Hydrophobic, High Ionic relative to O-D-PHI) had a stoichiometric ratio of 1: 20: 39<sup>8</sup>. The viscosity of the as prepared resin mixtures for O-D-PHI and HHHI precursors, prior to the addition of solvent, was measured using a MCR 301 rheometer (Anton Paar), equipped with a plane-plane geometry in aluminum (measuring system was 25 mm in diameter). The values of  $2.404 \pm 0.693$  Pa.s and  $0.04 \pm 0.011$  Pa.s were determined for O-D-PHI and HHHI respectively.

### **Polymerized vinyl-urethane materials**

The two DVO/MAA/MMA precursor resin mixtures were used to generate i) the bulk cast material or ii) the thin films materials from solutions containing THF.

For the bulk polyurethane material, briefly, the samples were generated by direct deposition of a drop (50  $\mu\text{L}$ ) solution consisting of the resin mixtures in 96-well polypropylene plates as previously reported<sup>8</sup>.

Thin films (in the low  $\mu\text{m}$ -range of thickness) were prepared by first diluting the PUs resin mixtures in THF in order to decrease their viscosity. Different ratios of the resin mixtures and THF were first investigated and it was established that a respective resin: THF ratio of 1:32 and 1:16 for the O-D-PHI and HHHI resin mixtures would enable the generation of thin films of similar thicknesses for the two compositions. The viscosity of the resin: THF solutions was measured to be 0.0003 Pa.s for both solutions. A drop of resin: THF solution (10  $\mu\text{L}$ ) was deposited on the 6 mm diameter CoCr discs before polymerization.

In both cases (thick bulk or thin film), the polymerization was initiated at 65°C during 1h (to allow solvent evaporation), followed by 24h under nitrogen at 110°C<sup>4,8</sup>. [Note: all experiments were carried out in triplicate, 3 times with 3 different syntheses].

## **Characterization of polyurethane based-materials**

### **Profilometry measurement**

A profilometer (Dektak 150 from Veeco) was used to obtain thicknesses measurements of D-PHI coatings. The reported thickness values correspond to the measurement of 3 independent scratches.

### **Scanning electron microscopy (SEM) and Energy Dispersive X-ray spectrometry (EDS)**

Samples were subjected to nickel metallization (2 x 30 seconds) and then underwent SEM using a LEICA S430i microscope operating in secondary electronics mode. The same field of view was then scanned using an energy-dispersive X-ray spectrometer (using Silicon

Drift detector) to acquire a set of X-ray maps for C, O and N using the PhiRhoZ method (Bruker AXS Microanalysis GmbH) and to characterize the atomic composition of the polymer surfaces.

#### **Atomic Force Microscopy (AFM)**

AFM experiments were performed in Peak Force QNM mode with a Dimension ICON microscope from Bruker. All measurements were carried out in air at room temperature with a ScanAsyst tip (Constant of stiffness  $k = 0.4 \text{ N/m}$ , Bruker). The sample measurements were carried out using both dry and wet states (water 18M-Ohm). All images were obtained using the same probe with the same peak force. Images were analyzed using NanoScope Analysis software version 1.5 from Bruker Nanoscope.

#### **Differential Scanning Calorimetry (DSC)**

DSC was carried out with a DSC Q100 model (TA Instrument). Polymer samples were placed in an aluminium cell (approximately 5 mg) and cooled at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Upon initial scans it was observed that the crystalline phases were below  $50^{\circ}\text{C}$ , and hence the heating thermograms were recorded from  $-60^{\circ}\text{C}$  to  $+50^{\circ}\text{C}$  at  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  under argon flow. Melting temperature values were taken as the onset point from the first heating cycle.

#### **Water Contact Angle (WCA)**

The samples were dried at room temperature for 72h in a desiccator and the contact angle measurements were performed on the different surfaces using a 10  $\mu\text{L}$  drop of pure water (18 M-Ohm resistivity) deposited with a micro syringe<sup>3</sup>. Values were measured for three drops on each of three separate samples per test group. The contact angle measurements were performed with a Drop Shape Analysis System KRUSS DSA 10MK2 goniometer. The results were analyzed using Drop Shape Analysis DSA 1 software.

## **Protein analysis**

### **Fibronectin preparation**

Fn was purified from pooled plasma isolated from different human donors following a three-step affinity chromatography process, as previously described by Poulouin *et al.*<sup>23</sup>. This purification process has been shown to yield protein in solution with a purity of approximately 98% (w/w). Fn concentration was determined by optical absorbance measurement  $A^{1\%}_{280\text{nm}} = 12.8$ .

### **Protein adsorption**

Protein adsorption was performed using human IgG (0.2 mg/mL, *sigma I4506*) or human plasma-derived Fn (0.1 mg/mL). Solutions were exposed to the substrates and protein adsorbed for 2h at 37°C. The substrates were then gently rinsed three times in PBS to remove loosely retained protein. Protein adsorbed substrates were incubated in 120  $\mu\text{L}$  of 2% Sodium dodecyl sulfate for 24h at room temperature. The bicinchoninic acid (BCA) assay was used to quantify the SDS eluates and was performed according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific). After elution by SDS, the surface was further assessed for residual protein by BCA assay, and none could be detected above the background of the substrates themselves, confirming the effectiveness of the SDS treatment for protein removal.

### **Quantification of specific protein sequences using monoclonal antibodies**

The presentation of Fn epitopes in the adsorbed protein state was measured by ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) as described in previous work<sup>3</sup>. Samples were incubated with monoclonal antibodies against specific Fn sequences: anti Cell-Binding Domain (dilution 1/30000) (*abcam*, *ab26245*) (III-9/10 domain), and anti N Terminal (dilution 1/43000000) (*Millipore*, *MAB1936*) (II-1/2 I-7/8/9 domain). Then, samples were incubated with a secondary antibody, anti-mouse IgG (dilution 1/1000) (*Thermo scientific*,



prod#31430). Bovine serum albumin (BSA) was used as a control to assess for non-specific interactions. The absorbance was normalized to the total Fn, as measured by the BCA assay described above.

Following the substrate coating with IgG, Fab exposure was quantified using an HRP-conjugated Fab-specific IgG (Sigma, A0293) and a tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution (eBioscience), with absorbance read at a wavelength of 450 nm. The absorbance was normalized to total IgG as measure by BCA assay described above.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using the SPSS Statistics 17.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL) for an analysis of variance (ANOVA). Statistical significance was reported for  $p < 0.05$ . Unless otherwise stated all experiments were repeated in triplicate with three technical replicates for each experimental value.

## **Results and Discussion**

### **Surface characterization for thin film of polyurethanes**

To mask the inherent bio-reactivity of metallic medical devices, some research has focused on the use of material coatings such as polyurethanes<sup>24</sup>, complex co-polymers (*e.g.* poly(hydroxystyrene-*b*-isobutylene-*b*-hydroxystyrene))<sup>25</sup>. However, it has been reported that polymer coatings are not entirely inert, and display hypersensitivity reactions to the polymer<sup>26</sup> with long-term adverse effects of increased inflammation<sup>27</sup>.

In the current study we have investigated CoCr substrates coated with a novel lysine-derived vinyl polymerized urethane platform material, by generating two formulations, O-D-PHI and HHHI. To work with thin films of D-PHI materials, it was essential to dilute the O-D-PHI and HHHI polymer resins in THF prior to their polymerization, in order to generate

the desired range of film thickness (note: the original resins were too viscous to generate low micron-thin films). The use of THF with D-PHI rather than its application in a neat form was anticipated to possibly influence the physical state of the material surfaces, as a previous study showed that the use of different solvents had an impact on the nature and crystallization of polypyrrole films<sup>28</sup>. The thickness was effectively reduced with the solvent cast materials, from the order of mm for bulk materials (*i.e.* O-D-PHI =  $1.4 \pm 0.1$  mm and HHHI =  $1.3 \pm 0.2$  mm) to  $\mu\text{m}$  for thin films when THF was used (*i.e.* O-D-PHI =  $4.9 \pm 1.3$   $\mu\text{m}$  and HHHI =  $5.2 \pm 1.8$   $\mu\text{m}$ ). Analysis using SEM/EDS images show that the CoCr surfaces coated with thin films of D-PHI were homogeneously covered (**Supplementary Figure S2**). The atomic composition analysis of the polymer coated surfaces (**Table 1**) shows a slight but significant decrease in carbon content between the bulk materials and thin films coated on CoCr. There was also a significant increase in oxygen and nitrogen on the thin films. Both of the latter atomic elements would be associated with the polar groups of the polymer which are interacting with the evaporating THF from the surface, and would draw the polar groups to the surface.

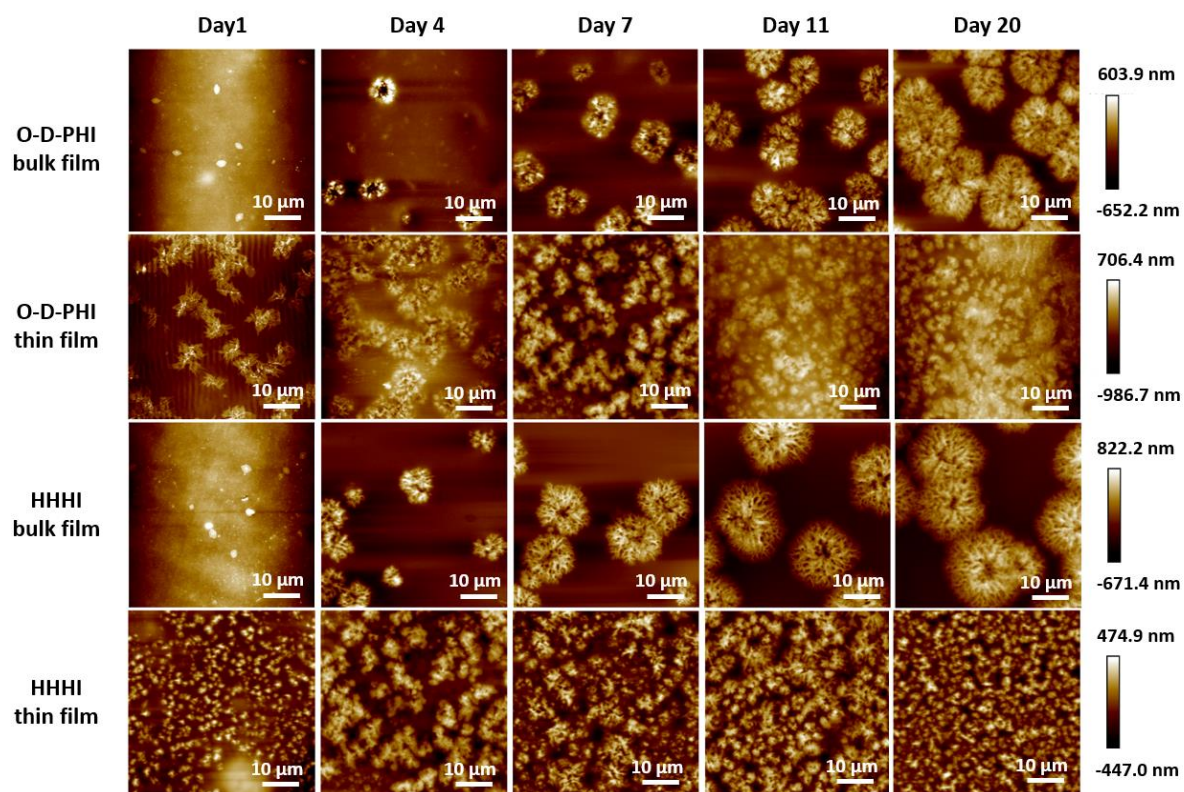
Surfaces Atoms (%)	O-D-PHI bulk	O-D-PHI thin film	HHHI bulk	HHHI thin film
Carbon	$66.9 \pm 2.1$	$64.6 \pm 3.0$ $\Phi$	$67.7 \pm 0.8$	$65.6 \pm 2.0$ $\#$
Oxygen	$29.8 \pm 1.3$	$31.7 \pm 2.6$ $\Phi$	$29.3 \pm 0.6$	$31.1 \pm 1.8$ $\#$
Nitrogen	$3.3 \pm 0.8$	$3.7 \pm 0.5$ $\Phi$	$3.0 \pm 0.2$	$3.5 \pm 0.4$ $\#$

**Table 1:** Atomic composition of surfaces with different polyurethane formulations obtained using EDS. Data are expressed in % as mean  $\pm$  SD, n=3 repeated 3 times, 5 different spots.

$\Phi$ p<0.001 between O-D-PHI bulk and thin film;  $\#$  p<0.001 between HHHI bulk and thin film.

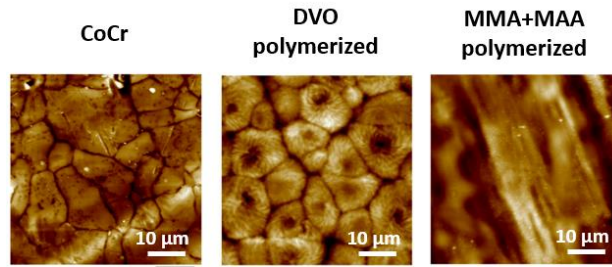
The inherent differences in surface chemical changes resulting from the solvent process subsequently led to the need to characterize the surface physical structure of the different materials as well as their chemical differences. **Figure 1** shows the presence of crystals (relatively hard domains by AFM) and amorphous zone (relatively soft domains by AFM) on the surface of the materials. Given that the oligomeric carbonate is the only component of the polymer system known to crystallize, it was hypothesized that the crystalline domains implicated the oligomeric urethane carbonate monomer within these crystal domains<sup>29</sup>. These crystal structures were different in appearance depending on film thickness (solvent cast *vs* non-solvent). On thin films, crystals were smaller but distributed over the entire surface whereas on bulk materials, crystals were much larger and not present across the whole surface.

**Figure 1** shows the results of a time course study that reveals a slow transformation of crystals over time, with the crystalline domains eventually forming homogeneously over the entire surface at some time between 11 and 20 days, although the density of crystals was greater for the THF processed thin films. The crystallization evolved more slowly for the non-solvent cast films *vs* the THF processed thin films of D-PHI. The process stabilized for all surfaces by approximately 20 days post polymerization. This is in accordance with other studies where the use of solvent in the generation of thin films based on polylactic acid reveals different re-organization of the chains by AFM<sup>30</sup>. The findings of the current work imply that a minimum of 20 days are required after the polymerization of the coated materials to enable a stabilized surface to be established for bio-characterization. All subsequent surface characterization and protein experiments were carried out at 20 days post synthesis. This included the data reported on **Table 1**.



**Figure 1:** Topography of CoCr surfaces with different D-PHI formulations: Crystal formation as a function of time in a dry environment with light. Images were obtained by Atomic Force Microscopy at 1, 4, 7, 11 and 20 days post synthesis.  $n=3$ , repeated 3 times. Scale Bar:  $10\ \mu\text{m}$ .

Since the crystallization of the D-PHI PUs was suspected to be driven by the presence of the polycarbonate (*e.g.* DVO) moiety and not the lower molecular weight vinyl monomer segments, we performed additional AFM experiments (**Figure 2**), to define the features of each relevant component.



**Figure 2** : Topography of CoCr surfaces and verification of the presence or not of crystals for polymerized DVO or MAA/MMA alone on the CoCr substrates. Images were obtained by Atomic Force Microscopy. n=3, repeated 3 times. Scale Bar:10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2** shows that only the DVO component and not the MMA/MAA component, when isolated alone and reacted, crystallizes from 1-day post polymerization. These results were further verified using DSC (**Table 2**), where a  $T_m^\circ$  was observed for the polymerized DVO, but no crystalline melt phase was found for the polymerized MMA/MAA material. Note that the  $T_m^\circ$  was the same for the four cast surfaces of D-PHI (thin film or bulk film) as well as for the polymerized DVO (*i.e.* approximately  $34^\circ\text{C} \pm 1$ ). These  $T_m^\circ$  values were identified during the first heat cycle. However, they were no longer detected in a second heat cycle, which suggests that it takes a long time for them to reform, as indicated by the kinetics of crystallization (**Figure 1**). The reported  $T_g$  for MAA is  $220^\circ\text{C}^{31}$ , and was also confirmed by DSC in our experiments, while the reported  $T_g$  value for MMA is  $105^\circ\text{C}^{32}$ , and shown to be  $120^\circ\text{C}$  by DSC in our lab. Neither of the materials show a crystal melt value at higher values.

Surfaces	Melting Temperature (°C)	Crystallization Temperature (°C)
O-D-PHI bulk	35°C	ND
O-D-PHI thin film	33°C	ND
HHHI bulk	34°C	ND
HHHI thin film	34°C	ND
Polymerized MAA/MMA	No detected	ND
Polymerized DVO	33°C	ND

**Table 2:** Thermal properties of different polyurethane surfaces and of different components for these polyurethanes. This table represents the melting temperature on the first heating cycle obtained by DSC. n=1, repeated 2 times. *ND* = No Detected

The formation of the crystals for all D-PHI materials (thin film and bulk material for both O-D-PHI and HHHI) was investigated under different environmental conditions. Whether that crystallization was allowed to proceed in a dry, or wet (*e.g.* water) environment, and in the presence of light or protected from light at room temperature, the formation of crystals proceeded for all materials over 20 days in a similar manner (hence we only report data for one condition (dry/light) in **Figure 1**). The final nature of the crystals was more defined by the combination of the polyurethane material and solvent than the combination of environments studied. Further, we examined the stability of the crystallized samples after they were formed. The behavior of the polymerized samples was investigated over three days in different conditions, exposed to a wet environment *vs* dry air, and in the light *vs* dark. Regardless of the combinations of the environmental condition's the crystals were preserved. From this work it was evident that crystals that have been formed in polymerized samples over 11 days at room temperature show relative stability at 37°C *vs* being completely melted if the sample was treated at 60°C for 24h (*Data not shown*). The melting value of pure polycarbonate oligomer as measured by DSC was in the range of 50-60°C which is in

agreement with previous work<sup>29</sup>. *Tang et al.* showed that the polyurethane oligomer's crystal melt temperature dropped to 45°C when copolymerized with other monomers. In the current study, the presence of other monomers co-polymerized with the polycarbonate oligomer reduced the oligomer's melt temperature to approximately 35°C.

The above findings provide for the first time the conditions needed to generate a stable and reproducible D-PHI substrate with respect to the relative distribution of carbonate, urethane, MMA and MAA moieties in the material, as well as their crystalline state. This was required for subsequent studies focused on determining the effect of relative chemical group distribution and concentration (*e.g.* O-D-PHI vs HHHI) on protein interactions with thin films formed on CoCr substrates.

### **Study of protein behavior**

Given that previous studies have described the importance of relative surface hydrophobicity to the nature of protein adsorption by entropic effects<sup>33</sup> and that there were shifts in relative polar chemistry associated with thin vs bulk cast films (**Table 1**), it was therefore of interest to examine the relative change in hydrophobicity on the thin film vs bulk film substrates using contact angle methods, with and without protein binding (**Table 3**).

Coating Surfaces	Bare surface	Surface coated with Fn	Surface coated with IgG
O-D-PHI bulk	83° ± 2.8	74° ± 3.6	71° ± 4.3
O-D-PHI thin film	76° ± 2.0	59° ± 5.3	57° ± 5.9
HHHI bulk	80° ± 3.8	72° ± 6.1	71° ± 5.1
HHHI thin film	77° ± 2.0	59° ± 2.0	62° ± 4.0
CoCr	56° ± 5.6	63° ± 5.0	69° ± 8.0

**Table 3:** Water contact angle measurements of different surfaces with different coatings.

Results are expressed in degrees as means ± S.D. n=3, repeated 3 times.

Since the mean square roughness of all surfaces was less than 221 nm (**Supplementary Table S1**), physical roughness can be ruled out as a major contributor to the differences in contact angle values, and the question of surface chemistry and crystal domain distributions become more relevant. The results show that the contact angle (**Table 3**) decreases between bulk material (*i.e.* O-D-PHI = 83° ± 2.8 and HHHI = 80° ± 3.8) and thin films of PUs (*i.e.* O-D-PHI = 76° ± 2.0 and HHHI = 77° ± 2.0). This is suspected to be a direct reflection of the slightly more polar character of the thin films (**Table 1**), and possibly due to the increased number of microdomains relative to more heterogeneous large domains. The surface of CoCr is much more hydrophilic than that of the coated polymer surfaces, with a value of 56° ± 5.6 which is in agreement with the literature (*i.e.* 59°)<sup>22</sup>. **Table 3** also reveals a decrease of hydrophobicity with the addition of proteins -Fn or IgG- on the four D-PHI surfaces. That change was irrespective of the D-PHI chemistry and was typically twice as great for the thin films (-17 and -18 for O-D-PHI and HHHI respectively) vs the bulk material (-9 and -8 for O-D-PHI and HHHI respectively). In contrast to the polymers with Fn or IgG adsorption, the contact angle increases on CoCr in the presence of protein. The differences

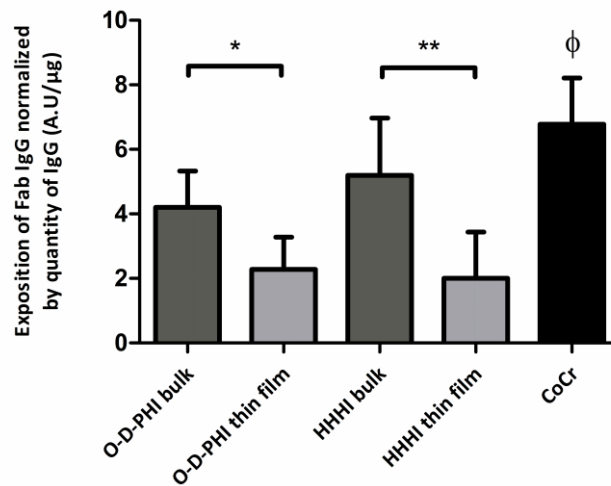


observed between the shifted contact angle values on the protein-coated PUs and protein-coated CoCr suggest that the manner by which Fn and IgG adsorbs onto the D-PHI surfaces and the CoCr was very different. It must be pointed out that contact angle analysis used to probe surface energetics alone provides an incomplete interpretation and understanding of the physical interactions with proteins<sup>34</sup>.

Therefore, we undertook studies at the molecular level using ELISAs. Given the availability of monoclonal antibodies, it was possible to study specific sequences of Fn and IgG that were exposed and therefore may be potentially be available for the cells to interact with. Gradually, as the proteins adsorb to the surface, it was hypothesized that they may undergo conformational changes in order to minimize the total free energy of the system<sup>35</sup>.

The results presented in **Figure 3** show that exposure of the Fab fragment related to IgG was significantly greater on CoCr than on the four D-PHI surfaces. Note that this exposure was significantly lower on thin films of PUs when compared to bulk material. When the surface contact angle was examined for all the materials (*e.g.* with *vs* without IgG), it was observed that there was a strong correlation ( $R^2 = 0.82$ ) between the change in contact angle and the level of Fab presentation for given surfaces (**Supplementary Figure S3**). Exposure of IgG Fab was previously reported to be a critical factor required to increase monocyte adhesion and propagation<sup>8,13</sup>. The ability of D-PHI to limit Fab exposure by binding IgG from the solution thus would be anticipated to minimize IgG activation of pro-inflammatory activity on adherent monocytes<sup>8</sup>. The significant decrease in IgG Fab segment exposure on D-PHI materials (**Figure 3**) appears to show that the chemistry of the PUs *vs* bare CoCr allows for a more passive adsorption of IgG, considered to be a marker of low inflammatory nature and hence the results suggest the importance of these biomaterials as immunomodulators. The observed differences in the adsorption and behavior of the IgG protein, between thin film *vs*

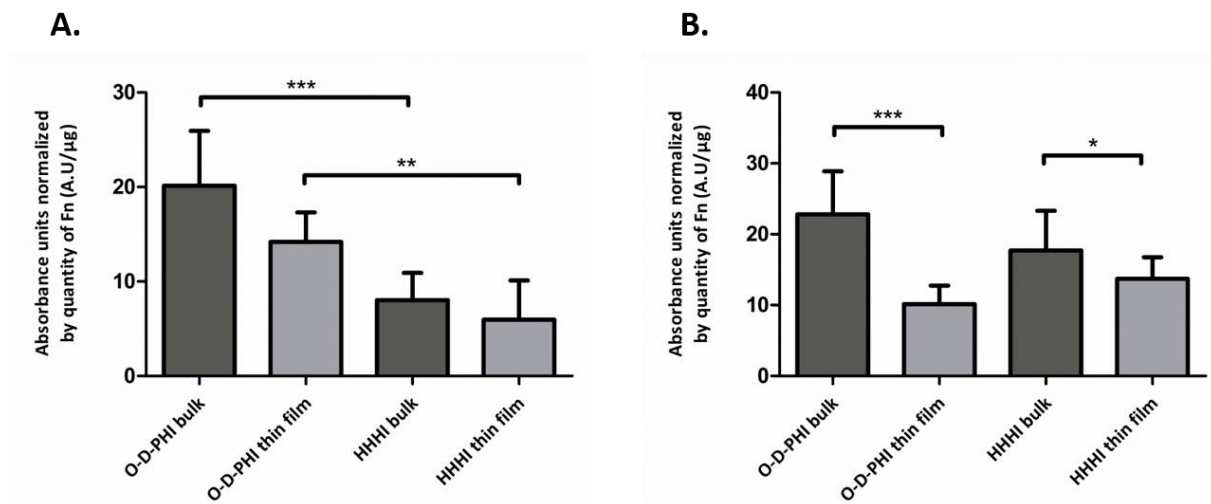
bulk material in novel, and suggest that small changes in surface atomic composition, as well as shape, size and distribution of the crystals (**Figure 1**) over the surface have a strong impact on presentation of the protein (also supported by contact angle data for the comparison of thin film vs bulk (**Table 3**)).



**Figure 3:** Quantification of Fab exposure measured by ELISA. Absorbance is normalized to IgG adsorbed quantity from the BCA assay. Results are expressed as means  $\pm$  S.D. n=3, repeated 3 times., \*p<0.05, \*\*p<0.01,  $\phi$ p<0.001 between CoCr vs PUs

Fn is known to have a role in inflammation *via* its Cell Binding Domain (CBD) and in coagulation through its N terminal segment. In order to better show the statistical differences between the four polymer coated surfaces, the values for the CoCr are only reported on in the text here and not compared in **Figure 4** so that statistical differences between the four polymers can be clearly seen. The availability of the CBD sequence was found to be 4 times greater on CoCr when compared to the different D-PHI coatings, with the value for CoCr = 85 A.U/µg (*Data not shown*), while D-PHI thin film or bulk materials being approximately between 10 to 20 A.U/µg respectively (**Figure 4 A**). Looking more closely at the four

polyurethane materials (**Figure 4 A**), there is a significant difference between O-D-PHI and HHHI bulk ( $p < 0.001$ ) and between O-D-PHI and HHHI thin films ( $p < 0.01$ ), showing that the different chemistries of PU lead to different behavior on adsorption of Fn and presentation of the CBD. The CBD contains the amino acid sequences RGD and PHSRN. The synergy between these two sequences favors the fusion of macrophages to form foreign Body Giant Cells (FBGC)<sup>15</sup> and activates monocytes through the VLA-5 receptor, thereby inducing the production of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) by these activated cultured human monocytes<sup>16</sup>.



**Figure 4:** Availability of Fn peptide sequences measured by ELISA on polymer coated CoCr surfaces. Two monoclonal antibodies are used: **A.** Cell binding Domain and **B.** N terminal Domain. Absorbance is normalized to Fn adsorbed quantity from the BCA assay. Results are expressed as means  $\pm$  S.D.  $n=3$ , repeated 3 times. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$

The availability of the N terminal domain on Fn (**Figure 4 B**) was significantly higher (e.g. 4-times) on bare CoCr as compared to bulk and thin D-PHI materials, with a value of 100 A.U./ $\mu$ g for CoCr vs values between 5 to 20 A.U./ $\mu$ g for PUs thin film or bulk polymer

**(Figure 4B)**. In a specific comparison of the four polyurethane coated materials, a significant difference was observed between O-D-PHI bulk and thin film ( $p < 0.001$ ), as well as HHHI bulk and thin film ( $p < 0.05$ ), suggesting that changes in surface topography related to shape, size and distribution of the crystals influences the availability of N terminal sequence of Fn. Again, the changes in surface contact angles (**Table 3**) also support that there would likely be a change in protein presentation between these surface features. The N terminal domain and more particularly the 70 kDa fragments of Fn play an important role in coagulation. This latter domain contributes to cross-linking activity within fibrin clots by formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysyl bonds, and catalyzed by the thrombin-activated coagulation factor XIII (FXIIIa, plasma transglutaminase)<sup>36</sup>. This cross-linking increases both thrombus size and platelet adhesion<sup>18</sup>.

The accessibility of Fn sequences (CBD and N-terminal) is therefore influenced differentially by two parameters, *e.g.* the chemical composition and the surface topography with the presence of crystals. These novel results further support fundamental work previously reported on for other materials<sup>3</sup> which showed an influence of the intrinsic chemistry of material on the availability of the Fn sequences. In other work, it has also been shown that material chemistry (polystyrene vs hydroxyapatite) influenced the adhesion of osteoblastic cells suggesting a different accessibility of Fn sequences<sup>37</sup>. Topography has also been shown to have a role in the availability of Fn sequences. Specially, in co-polymer systems, the chemistry of the polymers was kept the same but the distribution of the block components of the co-polymer was different, thereby causing a different topography of surfaces. These results yielded changes in the adsorption as well as availability of Fn peptide sequences<sup>38</sup>. Hence, our findings suggest that the chemistry of the D-PHI PUs as well as their processing in the form of thin films may allow for a more passive adsorption of proteins, which in turn could modulate the response of cells in a favorable manner with respect to both

inflammatory and coagulation processes. Importantly, and certainly not contemplated in earlier studies, this effect is more pronounced with the thin film of PUs than with the bulk cast PUs.

## **Conclusion**

The chemical and physical characterization of biomaterial surfaces with thin films of D-PHI on metallic substrates were studied here and yield novel discoveries with respect to protein/material interactions. The results show that the introduction of copolymeric D-PHI surfaces in combination with thin film structures appears to enhance the homogeneous nature of the surfaces. Exposure of IgG-Fab, and Fn derived CDB and N terminal domains was substantially reduced on all the D-PHI materials when compared to bare metal CoCr, and there was an overlaid differentiation of the D-PHI coatings, although substantially less than the difference observed for the CoCr vs D-PHI. The chemical diversity and the topography present in the structure of the D-PHI PUs may be a critical factor in supporting favorable biomaterial-protein interactions. The results also suggest that the use of polar solvents like THF slightly modified the D-PHI surfaces. Importantly these modifications appear to be favorable regarding the subsequent exposure of specific plasma protein sequences. The results are encouraging and support the need for further investigations with human blood cellular components, implicated in inflammatory and coagulation processes with thin films as these newly processed materials are behaving significantly different from their bulk counterparts. The latter would provide a more extensive assessment of the beneficial phenomena demonstrated here for the D-PHI PU surfaces.

## Acknowledgements

Natural Sciences and Engineering Research Council Synergy grant, French ministry of research (MENESR) and FFCR grant.

## References

- (1) Gogolewski, S. Selected Topics in Biomedical Polyurethanes. A Review. *Colloid & Polymer Science*. 1989, pp 757–785.
- (2) Santerre, J. P.; Woodhouse, K.; Laroche, G.; Labow, R. S. Understanding the Biodegradation of Polyurethanes: From Classical Implants to Tissue Engineering Materials. *Biomaterials* **2005**, 26 (35), 7457–7470.
- (3) Gossart, A.; Battiston, K. G.; Gand, A.; Pauthe, E.; Santerre, J. P. Mono vs Multilayer Fibronectin Coatings on Polar / Hydrophobic / Ionic Polyurethanes : Altering Surface Interactions with Human Monocytes. *Acta Biomater.* **2018**, 66, 129–140.
- (4) Battiston, K. G.; Labow, R. S.; Santerre, J. P. Protein Binding Mediation of Biomaterial-Dependent Monocyte Activation on a Degradable Polar Hydrophobic Ionic Polyurethane. *Biomaterials* **2012**, 33 (33), 8316–8328.
- (5) Sharifpoor, S.; Labow, R. S.; Santerre, J. P. Synthesis and Characterization of Degradable Polar Hydrophobic Ionic Polyurethane Scaffolds for Vascular Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules* **2009**, 10 (10), 2729–2739.
- (6) McDonald SM, Matheson LA, McBane JE, Kuraitis D, Suuronen E, Santerre JP, L. R. Use of Monocyte/Endothelial Cell Co-Cultures (in Vitro) and a Subcutaneous Implant Mouse Model (in Vivo) to Evaluate a Degradable Polar Hydrophobic Ionic Polyurethane. *J Cell Biochem* **2011**, 112(12):37.
- (7) Cheung, J. W. C.; Jain, D.; McCulloch, C. A. G.; Santerre, J. P. Pro-Angiogenic Character of Endothelial Cells and Gingival Fibroblasts Cocultures in Perfused Degradable Polyurethane Scaffolds. *Tissue Eng. Part A* **2015**, 21 (9–10), 1587–1599.
- (8) Battiston, K. G.; Ouyang, B.; Honarparvar, E.; Qian, J.; Labow, R. S.; Simmons, C. A.; Santerre, J. P.

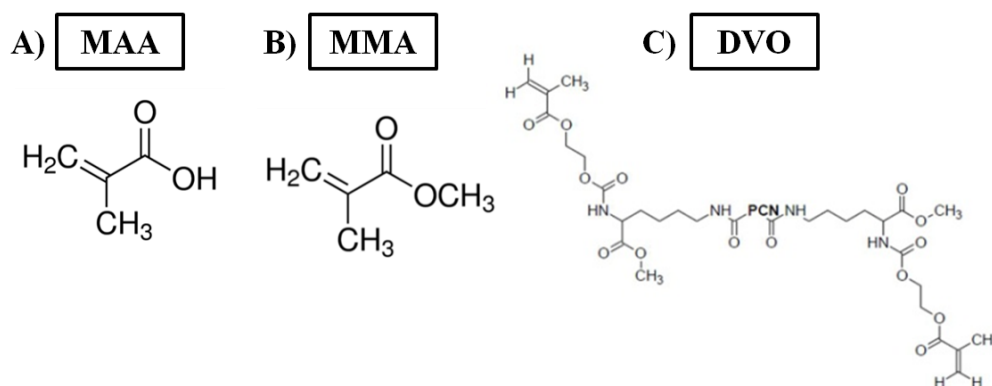
- Interaction of a Block-Co-Polymeric Biomaterial with Immunoglobulin G Modulates Human Monocytes towards a Non-Inflammatory Phenotype. *Acta Biomater.* **2015**, *24*, 35–43.
- (9) Anderson, J.; Rodriguez, A.; Chang, D. Foreign Body Reaction to Biomaterials. *Semin. Immunol.* **2008**, *20* (2), 86–100.
- (10) Thevenot W.; Tang, L., P. . H. Surface Chemistry Influence Implant Biocompatibility. *Curr. Top. Med. Chem.* **2008**, *8* (4), 11.
- (11) Shen, M.; Garcia, I.; Maier, R. V.; Horbett, T. A. Effects of Adsorbed Proteins and Surface Chemistry on Foreign Body Giant Cell Formation, Tumor Necrosis Factor Alpha Release and Procoagulant Activity of Monocytes. *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *70A* (4), 533–541.
- (12) Sudhakaran, P. R.; Radhika, A.; Jacob, S. S. Monocyte Macrophage Differentiation in Vitro : Fibronectin-Dependent Upregulation of Certain Macrophage-Specific Activities. *Glycoconj. J.* **2007**, *24* (1), 49–55.
- (13) Jenney, C. R.; Anderson, J. M. Adsorbed IgG: A Potent Adhesive Substrate for Human Macrophages. *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50* (3), 281–290.
- (14) Roumen Pankov, K. M. Y. Fibronectin at a Glance. *J. Cell Sci.* **2002**, *115*, 3861–3863.
- (15) Kao, W. J.; Lee, D.; Schense, J. C.; Hubbell, J. A. Fibronectin Modulates Macrophage Adhesion and FBGC Formation: The Role of RGD, PHSRN, and PRRARV Domains. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55* (1), 79–88.
- (16) Takizawa, T.; Nishinarita, S.; Kitamura, N.; Hayakawa, J.; Kang, H.; Tomita, Y.; Mitamura, K.; Yamagami, K.; Horie, T. Interaction of the Cell-Binding Domain of Fibronectin with VLA-5 Integrin Induces Monokine Production in Cultured Human Monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **1995**, *101* (2), 376–382.
- (17) Wilson, C. L.; Schwarzbauer, J. E. The Alternatively Spliced V Region Contributes to the Differential Incorporation of Plasma and Cellular Fibronectins into Fibrin Clots. *J. Cell Biol.* **1992**, *119* (4), 923–933.
- (18) Cho, J.; Mosher, D. F. Enhancement of Thrombogenesis by Plasma Fibronectin Cross-Linked to Fibrin and Assembled in Platelet Thrombi. *Blood* **2006**, *107* (9), 3555–3563.

- (19) Davis, J. R. Metals Handbook. *Met. Handb.* **1998**, 2571.
- (20) Marti, A. Cobalt-Base Alloys Used in Bone Surgery. *Injury* **2000**, *31*, D18–D21.
- (21) Ollivier, V.; Roques, C.; Receveur, N.; Gratz, M.; Feldman, L.; Letourneur, D.; Gachet, C.; Mangin, P. H.; Jandrot-Perrus, M. Bioreactivity of Stent Material: Activation of Platelets, Coagulation, Leukocytes and Endothelial Cell Dysfunction in Vitro. *Platelets* **2017**, *28* (6), 529–539.
- (22) Thirupathi, E.; Larson, M. K.; Mani, G. Surface Modification of CoCr Alloy Using Varying Concentrations of Phosphoric and Phosphonoacetic Acids: Albumin and Fibrinogen Adsorption, Platelet Adhesion, Activation, and Aggregation Studies. *Langmuir* **2015**, *31* (1), 358–370.
- (23) Poulouin, L.; Gallet, O.; Rouahi, M.; Imhoff, J. M. Plasma Fibronectin: Three Steps to Purification and Stability. *Protein Expr. Purif.* **1999**, *17* (1), 146–152.
- (24) Holmes, D. R.; Camrud, A. R.; Jorgenson, M. A.; Edwards, W. D.; Schwartz, R. S. Polymeric Stenting in the Porcine Coronary Artery Model: Differential Outcome of Exogenous Fibrin Sleeves versus Polyurethane-Coated Stents. *J. Am. Coll. Cardiol.* **1994**, *24* (2), 525–531.
- (25) Sipos, L.; Som, A.; Faust, R.; Richard, R.; Schwarz, M.; Ranade, S.; Boden, M.; Chan, K. Controlled Delivery of Paclitaxel from Stent Coatings Using Poly(Hydroxystyrene-*b*-Isobutylene-*b*-Hydroxystyrene) and Its Acetylated Derivative. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (5), 2570–2582.
- (26) Sheiban, I.; Villata, G.; Bollati, M.; Sillano, D.; Lotrionte, M.; Biondi-Zoccai, G. Next-Generation Drug-Eluting Stents in Coronary Artery Disease: Focus on Everolimus-Eluting Stent (Xience V??). *Vascular Health and Risk Management*. 2008, pp 31–38.
- (27) Dicesare, P.; Fox, W. M.; Hill, M. J.; Krishnan, G. R.; Yang, S.; Sarkar, D. Cell-Material Interactions on Biphasic Polyurethane Matrix. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2013**, *101 A* (8), 2151–2163.
- (28) Abdou Karim DIAGNE DIAW, Diariatou GNINGUE-SALL, Abdoulaye KONE, G. D.; DIENG, M. M. Electropolymerisation Du N-Phenylpyrrole, Étude de l'effet de Sel et de Solvant; Effet Catalytique Du Pyrrole Sur Le Processus d'electropolymerisation Du N-Phenylpyrrole. Caractérisation Spectroscopique Des Films. *J. Soc. Ouest-Afr. Chim* **2006**, *21* ; 77-85.
- (29) Tang, Y. W.; Labow, R. S.; Santerre, J. P. Enzyme-Induced Biodegradation of Polycarbonate Polyurethanes: Dependence on Hard-Segment Concentration. *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *56* (4), 516–

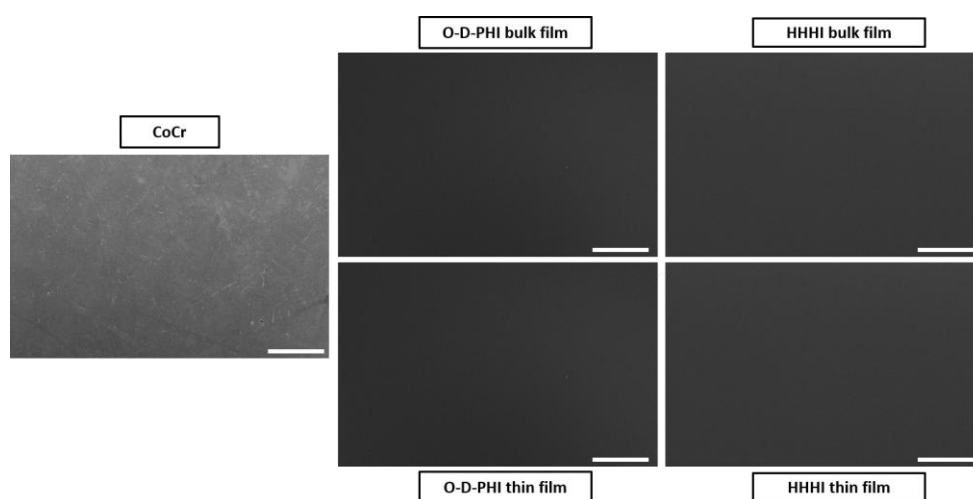


- 528.
- (30) A. Narladkar; Balnois, E.; Vignaud, G.; Grohbens, Y.; Bardeau, J. F. Morphology and Glass Transition of Poly(Lactic Acid) in Supported Thin Films. *Polym. Eng. Sci.* **2008**, *48* (9), 1655–1660.
- (31) M. Teresa Garay, M. C. L. and E. I. Study of Polymer-Polymer Complexes and Blends of Poly(N-Isopropylacrylamide) with Poly(Carboxylic Acid): 1. Poly(Acrylic Acid) and Poly(Methacrylic Acid). *Polymer (Guildf)*. **1997**, *38*, 5091–5096.
- (32) Teng, H.; Koike, K.; Zhou, D.; Satoh, Z.; Koike, Y.; Okamoto, Y. High Glass Transition Temperatures of Poly(Methyl Methacrylate) Prepared by Free Radical Initiators. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **2009**, *47* (1), 315–317.
- (33) D. Schmidt, H. W. and W. K. Protein Adsorption to Biomaterials. In *Biological Interactions on Materials Surfaces*; 2009; pp 1–18.
- (34) Hill, M. J.; Cheah, C.; Sarkar, D. Interfacial Energetics Approach for Analysis of Endothelial Cell and Segmental Polyurethane Interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2016**, *144*, 46–56.
- (35) Rabe, M.; Verdes, D.; Seeger, S. Understanding Protein Adsorption Phenomena at Solid Surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2011**, *162* (1–2), 87–106.
- (36) Mosher, D. F. Cross-Linking of Cold-Insoluble Globulin by Fibrin-Stabilizing Factor. *J. Biol. Chem.* **1975**, *250* (16), 6614–6621.
- (37) Hindié, M.; Camand, E.; Agniel, R.; Carreiras, F.; Pauthe, E.; Van Tassel, P. Effects of Human Fibronectin and Human Serum Albumin Sequential Adsorption on Preosteoblastic Cell Adhesion. *Biointerphases* **2014**, *9* (2), 029008.
- (38) Schricker, S. R.; Palacio, M. L. B.; Bhushan, B. Antibody Sensed Protein Surface Conformation. *Mater. Today* **2011**, *14* (12), 616–621.

Supplementary Figures



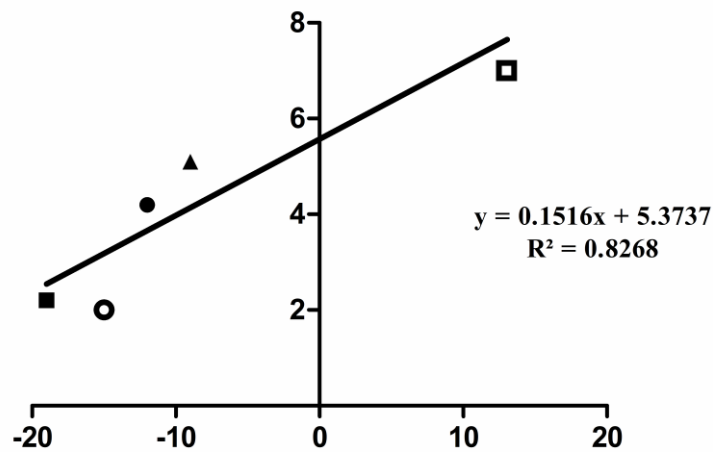
**Supplementary Figure S1:** Schematic representation of the D-PHI's monomers. A) methacrylic acid (MAA) with its pendent carboxylic acid group which provides the polymer with the anionic content. B) methyl methacrylate (MMA) with its pendent methyl group which provides hydrophobic character. C) divinyl oligomer (DVO) with its carbonates and urethanes which provide non-ionic polar character. All materials react with each other via their vinyl groups in a free radical polymerization.



**Supplementary Figure S2:** Topography of CoCr surfaces coated with D-PHI or not, obtained by Scanning Electron Microscopy (SEM), n=3, repeated 3 times. Scale bar: 400  $\mu\text{m}$ .

Surfaces	Roughness (nm)
O-D-PHI bulk	212 ± 11
O-D-PHI thin film	197 ± 43
HHHI bulk	221 ± 30 *
HHHI thin film	166 ± 23

**Supplementary Table S1:** Roughness of the different surfaces obtained by AFM. Results are expressed as means ± S.D. n=3, repeated 3 times. \*p<0.05 between HHHI bulk and thin film



**Supplementary Figure S3:** Correlation between the relative change in surface contact angle for all the materials (with vs without IgG) and the level of Fab presentation. O-D-PHI bulk: *black circle*, O-D-PHI thin film: *black square*, HHHI bulk: *black triangle*, HHHI thin film: *white circle* and CoCr: *white square*

### **Conclusion**

Pour le recouvrement de surface du CoCr, des films minces de polyuréthanes ont été générés. Le tétrahydrofurane a été utilisé comme solvant pour diluer les solutions de D-PHI afin d'obtenir des films micrométriques. La caractérisation physico-chimique montre un recouvrement homogène du CoCr par ces films minces de polyuréthane de quelques microns d'épaisseur. L'utilisation du solvant a légèrement modifié les propriétés physiques et chimiques des films minces comparés aux matériaux épais avec notamment une apparition de cristaux au cours du temps plus rapide, due à l'utilisation du solvant. L'exposition du Cell Binding Domain et N terminal Domain de la fibronectine ainsi que le Fab-IgG est réduite sur tous les matériaux D-PHI (films minces et matériaux épais) par rapport au CoCr nu. Les résultats ont également montré que l'exposition du segment Fab de l'IgG et du domaine N Terminal de la Fn est influencée par la topographie de surface des matériaux et non par la formulation. En revanche la disponibilité du CBD de la Fn est influencée par la chimie intrinsèque des matériaux. La diversité chimique et la topographie de surface présentes dans la structure des polyuréthanes D-PHI peuvent être un facteur critique pour permettre des interactions favorables entre biomatériaux et protéines. Les légères modifications de surface avec l'utilisation d'un solvant semblent être favorables en ce qui concerne l'exposition ultérieure de séquences spécifiques de protéines plasmatiques telles que l'IgG et la Fn.

Les résultats sont encourageants et confirment la nécessité de poursuivre les recherches sur l'activation des composants cellulaires du sang, impliqués dans les processus inflammatoires et dans la coagulation. Ceci permettrait une évaluation plus approfondie des phénomènes bénéfiques démontrés ici pour les surfaces de D-PHI.

### III. Article 3

#### **Mitigation of monocyte driven thrombosis on Cobalt Chrome surfaces in contact with whole blood by thin film polar/hydrophobic/ionic polyurethane coatings**

**Audrey Gossart<sup>a,b,c</sup>, Didier Letourneur<sup>a</sup>, Adeline Gand<sup>b</sup>, Véronique Regnault<sup>d</sup>, Mohamed Amine Ben Mlouka<sup>e</sup>, Pascal Cosette<sup>e</sup>, Emmanuel Pauthe<sup>b</sup>, Véronique Ollivier<sup>a\*\*</sup> and J. Paul Santerre<sup>c\*</sup>**

<sup>a</sup> *Laboratory for Vascular Translational Science (LVTS), Inserm U1148, Université Paris Diderot, Université Paris 13, Hôpital Bichat, Paris, France*

<sup>b</sup> *Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire-Cellules (ERRMECe), Biomaterial for Health Research Group, Institut des Matériaux, Maison International de la Recherche, Université de Cergy-Pontoise, 95000 Neuville sur Oise, France*

<sup>c</sup> *Translational Biology and Engineering Program, Ted Rodgers Centre for Heart Research, Institute of Biomaterials and Biomedical Engineering (IBBME) and the Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada*

<sup>d</sup> *Université de Lorraine, Inserm, DCAC, F-54000 Nancy, France*

<sup>e</sup> *Polymers, Biopolymers, Surface Laboratory, UMR 6270 CNRS, Normandie University, Mont-Saint-Aignan, France*

**\*\* Corresponding Author: Véronique OLLIVIER**, LVTS, UMR\_S1148, Hôpital Bichat, 46 rue Henri Huchard, 75877 Paris cedex 18 France. E-mail: [veronique.ollivier@inserm.fr](mailto:veronique.ollivier@inserm.fr) and **\* Corresponding Author: J Paul SANTERRE**, IBBME, Faculty of Dentistry, 661 University Ave, 14<sup>th</sup> floor, Room 1435, Toronto, ON, M5G 1M1, Canada. Email: [paul.santerre@utoronto.ca](mailto:paul.santerre@utoronto.ca)

**Keywords:** Cobalt chrome, polyurethane films, Whole blood, Tissue Factor, Thrombin generation, Monocytes

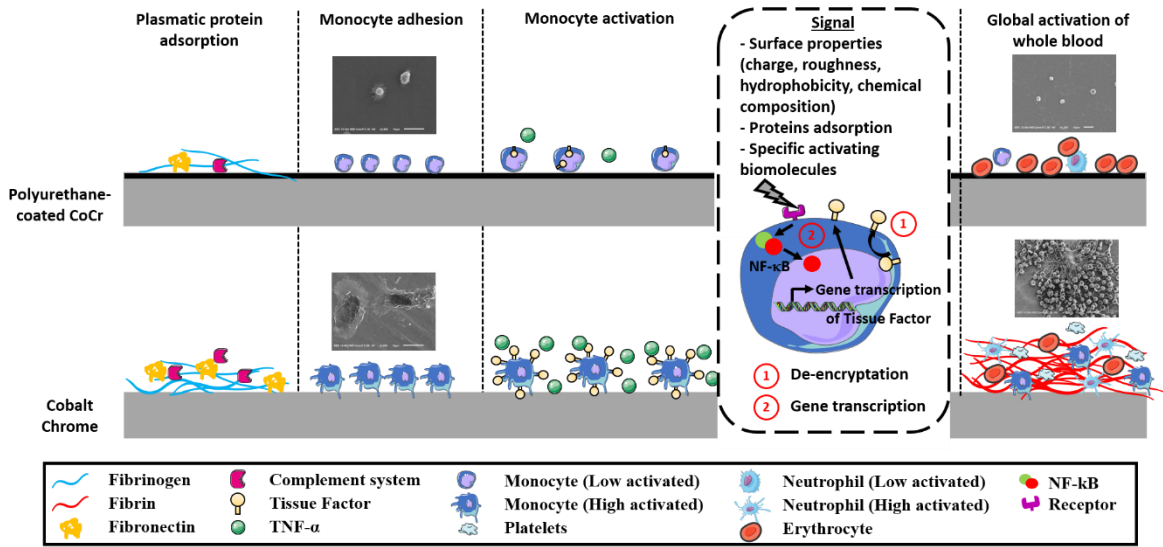
This work has been accepted in the journal: **Biomaterials**, 25<sup>th</sup> June 2019, *In press*

### **Résumé**

Un des problèmes majeurs constaté après implantation d'un biomatériau dans le domaine cardiovasculaire est l'apparition d'une thrombose après contact avec le sang. Dans ce contexte, les monocytes jouent un rôle essentiel car ils sont impliqués à la fois dans les processus d'inflammation et de coagulation. En effet, ils sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires et d'exprimer le facteur tissulaire, initiateur important de la voie extrinsèque de la coagulation. Le cobalt chrome (CoCr), un alliage métallique utilisé dans la fabrication des endoprothèses vasculaires, s'est révélé potentiellement pro-thrombotique et pro-inflammatoire. Afin de masquer ces propriétés, la stratégie a donc été de recouvrir la surface de CoCr par un polyuréthane spécifique, le HHHI. En effet, des études précédentes ont montré qu'il favoriserait une réponse anti-inflammatoire des monocytes. L'objectif de ces travaux a été d'étudier la réactivité du sang au contact de CoCr recouvert de films minces de polyuréthane (HHHI), et en particulier de déterminer si ces films minces pouvaient masquer les effets pro-thrombotique et pro-inflammatoire du CoCr.

Les résultats ont montré que la présence de films minces de HHHI à la surface du CoCr limite la génération de thrombine, l'activation de la coagulation et la formation d'un réseau intense de fibrine au contact de sang total par rapport au CoCr nu. L'activation de monocytes purifiés a également été atténuée à la surface du CoCr recouvert de polyuréthane avec une génération de thrombine, de facteur tissulaire et une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires fortement diminuées. Ces résultats ont également été observés avec l'étude des macrophages. L'identification des protéines adsorbées à la surface de HHHI incubé avec du plasma pauvre en plaquettes a montré des quantités inférieures de fibrinogène, de fibronectine et de complément C3, C4 et C8 par rapport au CoCr, ces protéines étant connues pour avoir un rôle dans la coagulation et/ou l'inflammation. La présence de films minces de HHHI sur le CoCr réduit donc le phénotype pro-thrombotique et pro-inflammatoire des monocytes et des macrophages et empêchent l'activation de la coagulation conduisant à la formation d'un réseau de fibrine en présence de sang total.

**Graphical abstract**



## **Abstract**

Monocytes are at the crossroads between inflammation and coagulation processes since they can secrete pro-inflammatory cytokines and express tissue factor (TF), a major initiator of coagulation. Cobalt-chrome (CoCr), a metal alloy, used as a biomaterial for vascular stents, has been shown to be potentially pro-thrombotic and pro-inflammatory. Research work with family of degradable-polar hydrophobic ionic polyurethanes (D-PHI), call HHHI, has been shown to exhibit anti-inflammatory responses from human monocytes. We have generated here multifunctional polyurethane thin films (MPTF) based on the HHHI chemistry as thin coating for CoCr and have evaluated the reactivity of blood with MPTF-coated CoCr. The results showed that the coating of CoCr with MPTF derived from HHHI prevents thrombin generation, reduces coagulation activation, and suppresses fibrin formation in whole blood. Activation of monocytes was also suppressed at the surface of MPTF-coated CoCr and specifically the decrease in thrombin generation was accompanied by a significant decrease in TF and pro-inflammatory cytokine levels. Mass spectroscopy of the adsorbed proteins showed lower levels of fibrinogen, fibronectin and complement C3, C4, and C8 when compared to CoCr. We can conclude that MPTFs reduce the pro-thrombotic and pro-inflammatory phenotype of monocytes and macrophages on CoCr, and prevented clotting in whole blood.

## **1. Introduction**

A dominant limitation of cardiovascular related biomaterial implants in whole blood is the challenge of thrombosis. Specifically, stent thrombosis remains an important issue because of its serious adverse effects on patient care [1]. Studies have focused largely on minimizing coagulation through the adhesion of biomolecules that reduce clotting protein



activation and the adhesion / activation of platelets. In the context of thrombosis related to biomaterials, the multi-faceted nature of all the main blood components renders a biological approach quite challenging, since the factors associated with the complement system and leukocytes have also been implicated in coagulation protein and platelet activation pathways. Unfortunately, many biomaterial studies have been limited in their assessment of leukocytes in their analysis of clot formation. These latter cells are more often studied in the context of inflammation and tissue integration. Yet, over the last decade the hematology field has clearly accentuated and delineated their role in thrombosis [2–4]. Hence, related clotting and pro-inflammatory states have to be considered simultaneously in biomaterial design [5].

Monocytes reside at the crossroads of inflammation and coagulation processes [2–4]. They are among the first cells to arrive at the site of injury post implantation [6]. In blood, human monocytes are the major source of tissue factor (TF). In the resting condition, monocytes express low levels of intracellular TF. However, pathological activation leads to a rapid and transient expression of TF by monocytes. For example, bacterial lipopolysaccharide induces monocytic TF expression *in vitro* and *in vivo* [7,8]. This TF expression is under the control of the transcription factor NF- $\kappa$ B [9]. TF is a major initiator of blood coagulation [10]. Blood contact with biomaterials represents a potential exogenous stimulus to induce TF expression by monocytes. For example, TF expression by monocytes has been observed *in vivo* during or after cardiopulmonary bypass [11,12]. TF is a high affinity receptor for factor VII and activated FVII (FVIIa). The formation of the TF-FVIIa complex is responsible for the first traces of thrombin generated *via* the activation of factor X and IX [13,14]. Moreover, monocytes are of particular importance in the remodeling of tissues around long-term implanted biomaterials. After recruitment to the site of inflammation, monocytes will differentiate into macrophages that can have a pro- or an anti-inflammatory phenotype and influence the outcome of tissue regeneration and wound healing. Therefore, the effect of

macrophages can be beneficial or deleterious. Post implantation, a biomaterial can be encapsulated and rejected *via* a classical foreign body response (FBR) generated by the immune system [15,16], which involves the fusion of macrophages to form foreign body multinucleated giant cells (FBGC). The presence of the latter cells are characteristic of chronic inflammation [17].

Cobalt chrome (CoCr) is a metal alloy used in the fabrication of vascular stents [18,19]. It is non-magnetic, resistant to wear, corrosion and heat, and is often described as being “biocompatible” [20,21]. However, this material has severe limitations with respect to blood compatibility. Previous studies have shown that bare CoCr is pro-thrombotic and pro-inflammatory due to its ability to activate platelets and coagulation factors, and to induce leukocyte adhesion and activation [22,23]. A strategic approach to improve this material is to generate thin film coatings of biomaterials using polymers and/or bioactive molecules. For example, previous studies have shown that CoCr can be surface modified using phosphoric acid in order to alter its wettability, change the surface chemistry, and reduce the roughness features [23]. Modification of these properties influences the adsorption of fibrinogen (Fg) and albumin resulting in a decrease of platelet adhesion and activation [23]. Another candidate for coating includes the class of polymers defined as polyurethanes (PUs). PUs have excellent mechanical properties and depending on the selected chemistry, have exhibited moderate to good blood compatibility, in part because of the phase domain structure [24]. Further, they are generally easy to prepare in various forms. For example, the use of polymers consisting of 1,4 diisocyanatobutane (BDI)-based poly(ester-urethane) ureas and poly(ether-ester-urethane) ureas have been shown to be of interest for the development of cardiovascular devices [25,26].

A particular polyurethane of interest to our work is a polyfunctional polyurethane (referred to as D-PHI, or Degradable Polar/Hydrophobic/Ionic). D-PHI is a platform of

multiple polymers with multifunctional chemistry. In their original formulations, these were developed to contain a divinyl polycarbonate-lysine urethane oligomer –DVO-, methacrylic acid –MAA- and methyl methacrylate –MMA- (**Supplementary Figure S1**). D-PHI has been shown to be generally quite compatible and non-toxic to multiple cell types when used in the engineering of vascular tissues with vascular smooth muscle cells (VSMCs) [27], endothelial cells [28] and fibroblasts [29]. Furthermore, the D-PHI platform has been shown to reduce the pro-inflammatory activation of monocytes when compared to tissue culture polystyrene (TCPS) and polylactic glycolic acid (PLGA) [30,31], two very prominent materials reported on in the biomedical literature. The block structure chemistry of D-PHI has been formulated by varying the hydrophobic and anionic monomer content relative to the polar divinyl oligomer content in order to obtain a range of formulations that differentially interact with human monocytes. For example, a specific DVO/MAA/MMA ratio of 1: 20: 39 (referred to as HHHI, high hydrophobic and high ionic) has been reported to promote a significant reduction in inflammatory biomarkers released from human blood monocytes relative to that of original D-PHI formulation with a 1: 5: 15 ratio [31,32]. Battiston et al., showed that the surface of HHHI exhibited less presentation of the Fab-IgG binding site than the 1:5:15 ratio of monomers. Since previous studies have implicated the Fab domain as being critical for monocyte–biomaterial interactions [33], the selection of the HHHI material is of inherent interest to the current work. None of the physical properties which have been measured and previously reported on to compare HHHI vs. the original D-PHI formulation, such as contact angle, surface chemical group composition via X-ray photoelectron spectroscopy, gel content (monomer conversion) were shown to explain the differences in protein (IgG) or cellular (monocyte) interactions observed with the change in chemistry introduced by HHHI. This suggests that it may be more the distribution of the different chemical functional groups associated with the specific change in chemistry that is possibly implicated as the primary

mediator resulting in different protein binding and presentation of Fab activating groups to the cells, followed by the subsequent cellular responses observed with this material [31,32].

We have generated multifunctional polyurethane thin films (MPTF) (5  $\mu\text{m}$  thick) of HHHI in order to study their use as thin coatings for CoCr [34]. The HHHI formulation was characterized in a previous study and their surface morphology, wettability and thickness were reported by Gossart *et al.* [34]. Note that at no time in our studies at 37°C did we see any sign of delamination. We have shown that the exposure of specific sequences of fibronectin (Fn) and immunoglobulin G (IgG) (Fab-IgG, and the cell binding domain (CBD) and N terminal domain of Fn) were significantly lower on materials coated with this PU when compared to bare metal CoCr. Further, in other work by Battiston *et al.* [31] it was specifically shown when using defined inhibitors of the IgG Fab domains that this domain, in preference to the Fc domain of IgG, was highly correlated to reduced monocyte activation upon exposure to different biomaterials. This process was highly dependent on the relative anionic content in the polymer. In the work of Gossart *et al.*, [32] it was further shown to be beneficial with respect to regulating monocyte activation. Given the prevalence of tissue factor in activated monocytes in vascular systems, it was of interest to investigate the use of the HHHI material with respect to addressing monocyte activated pro-thrombotic events.

The objective of the current study was therefore to evaluate the reactivity of blood on MPTF coated onto CoCr, and in particular to determine if thin films of the HHHI materials on the order of a few micrometers would be able to mask the pro-thrombotic and pro-inflammatory effects of CoCr from whole blood elements. In the first phase of this work, we studied the activation of coagulation from whole blood in contact with these biomaterials, whereas in the second phase of the work, we assessed the molecular and blood element behavior of individual cells, specifically monocytes and macrophages, in order to elucidate

key mechanistic pathways involved for the HHHI coated CoCr substrates in comparison to non-coated CoCr.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Cobalt-Chrome discs**

Electropolished CoCr discs (L605, 6 mm diameter, 0.25 mm thickness) were purchased from Goodfellow (Lille, France). These discs were designed to fit into the wells of 96-well plates. Before using them in the experiments, the CoCr discs were incubated with 70% ethanol for 1h at room temperature and rinsed with PBS. Some CoCr discs were incubated with 1% human serum albumin (HSA) endotoxin free (Bio-pure, Clinisciences, Nanterre, France) for 2h at 37°C, and were used as a negative control with respect to blood thrombus formation. All experiments were performed in 96-well plates.

### **2.2. HHHI coating preparations**

HHHI synthesis was carried out using previously established methods [27]. Divinyl oligomer (DVO), methacrylic acid (MAA) and methyl methacrylate (MMA) at a stoichiometry of 1: 20: 39 [31] were mixed with the initiator benzoyl peroxide (BPO, 0.032 mol/mol vinyl group). The resin mixture was diluted in tetrahydrofuran (THF) (250 µL of the resin mixture with 3.750 ml of THF) and cast onto CoCr discs, to generate thin films as previously described [34]. Subsequent to adding the resin/THF solution onto the CoCr substrates, the polymerization was then performed at 65°C for 1h, and completed at 110°C for 24h under nitrogen gas purge [30,31].

### **2.3. Blood collection**

Whole human blood was obtained from healthy volunteers who were exempt of medication for at least 10 days, following full informed consent, according to the Declaration of Helsinki. Legal and ethical authorization for the use of collected blood for research was obtained through a national convention between the French National Institutes of Health and Medical research (INSERM) and the French Blood Institute (EFS; convention number A18ZPA07000011). Blood was collected *via* venipuncture into siliconized Vacutainer™ tubes (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) containing different anticoagulants as specified in the following procedures.

### **2.4. Monocytes and macrophages**

Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated whole blood was centrifuged at 120 g for 15 min. The buffy coat was collected and monocytes were further purified using anti-CD14-coated microbeads according to the manufacturer's instructions (Myltenyi Biotec, Paris, France). Pure monocytes (>98%) were resuspended in RPMI medium without fetal calf serum. For the different experiments, the monocyte concentration was adjusted to either 100 000 or 300 000 monocytes/mL, as specified in the following studies.

Monocytes were incubated 8 days with 5% fetal calf serum RPMI at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> to allow for the differentiation towards macrophages. The latter population was used to perform macrophage related experiments.

### **2.5. Preparation of platelet-free plasma (PFP)**

Platelet-free plasma (PFP) was prepared from citrated blood (sodium citrate 0.129 M) using a double centrifugation protocol. Whole blood was centrifuged at 1200 g for 15 min. The PFP was then collected and centrifuged at 13000 g for 3 min.

## **2.6. Scanning Electron Microscopy (SEM)**

SEM was performed on samples incubated in whole blood (anticoagulated with lithium heparinate) after 24h of incubation at 37°C and for monocytes/macrophages prepared from EDTA anticoagulated blood after 24h of incubation at 37°C for monocytes and 8 days of incubation at 37°C for macrophages. All samples were rinsed with PBS and fixed with a 3% glutaraldehyde solution overnight at 4°C, subjected to ethanol dehydration, and then underwent gold metallization (2x 1 min). Samples were analyzed using a JEOL It 100 scanning electron microscope, at an operating voltage of 10 kV. The semi-quantification of monocyte surface area was obtained using Image J software.

## **2.7. Immunofluorescence of whole blood components**

Surfaces were rinsed with PBS, fixed with a 4% para-formaldehyde solution for 20 min at room temperature and then rinsed with PBS. The permeabilization of the cells was performed with PBS-Triton 0.1%-Tween 20 0.05% for 15 min at room temperature. Non-specific binding sites were blocked by incubating the substrates in PBS-BSA 3% for 1 h at room temperature. Nuclei were labelled using NucBlue (Invitrogen). Specific antibodies were used to label fibrin (Clone 59D8, generous gift from Pr. CT. Esmon [35]), leukocytes (CD45, clone YTH24,5, ABD Serotec) and platelets (CD42b, clone SZ2, Beckman Coulter). Images were recorded with a LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss).

## **2.8. Thrombin generation**

Thrombin generation on the different surfaces was measured using citrated whole blood or in the presence of pre-seeded purified monocytes with PFP, by means of the Calibrated Automated Thrombogram (CAT) method [36] (Thrombinoscope BV, Maastricht, Netherlands).

Thrombin generation studies for whole blood experiments were carried out as follows. Paper discs (5 mm diameter and 180  $\mu\text{m}$  thickness) (Whatman 589/1, Whatman GmbH) were placed in flat-bottom wells of a 96-well polystyrene microplate (Thermo Electron Corporation). Separately, 30  $\mu\text{L}$  of citrated whole blood was incubated in the different condition (CoCr and CoCr coated with HSA or HHHI) was mixed with 10  $\mu\text{L}$  of P2Rho, a rhodamine-based thrombin substrate (1.8 mmol/L) and 20  $\mu\text{L}$   $\text{CaCl}_2$  (50 mmol/L). Immediately after mixing, 5  $\mu\text{L}$  of the mixture were loaded onto the paper discs and covered with 40  $\mu\text{L}$  of mineral oil (USB Corporation). In parallel, a calibration experiment was carried out where the  $\text{CaCl}_2$  containing solution was replaced with 20  $\mu\text{L}$  of a thrombin calibrator (300 nmol/L thrombin activity, Diagnostica Stago, Asnières, France). The fluorescence signal from the instrument was recorded with a Fluoroskan Ascent microplate fluorometer at an excitation of 485 nm and emission of 538 nm (Thermolabsystems). Samples were run at least in triplicate and the experiment repeated a minimum of three times. The calibrated thrombin generation curves were calculated as previously described [37]. All procedures were performed at 37°C in the absence of exogenous TF.

For monocyte coated substrates, measurements were conducted with 80  $\mu\text{L}$  PFP in a total volume of 120  $\mu\text{L}$ . Thrombin generation was performed in the absence of TF. Samples that were spiked with 20  $\mu\text{L}$  thrombin calibrator (Diagnostica Stago, Asnières, France) were run in parallel with each cycle of test sample. Thrombin generation was triggered by the addition of 20  $\mu\text{L}$  FluCa (2.5 mM fluorogenic substrate Z-Gly-Gly-Arg-AMC, 87 mM calcium chloride). The fluorescence level was read using a Fluoroskan Ascent reader (Thermo Labsystems) equipped with a 390/460 nm filter set, and thrombin generation curves were calculated using the thrombinoscope software. The velocity index (nM/min) values for the latter protocol was calculated as the ratio [Peak/(time to Peak-LagTime)]. LagTime (LT) is related to the initiation phase of coagulation on the thrombinoscope. The velocity index is



related to the initiation and amplification phase of coagulation. The endogenous thrombin potential (ETP) represented the total activity of thrombin generated.

### **2.9. Tissue Factor activity assay**

TF activity at the surface of adherent monocytes was determined as the ability of monocytes to promote factor X activation in the presence of activated factor VII (factor VIIa, *Novoseven*, 10nM) using a chromogenic activity assay [38]. The specificity of the assay was ascertained by using a blocking anti-TF MoAb (CD 142, clone HTF-1, BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France). A standard curve was constructed using relipidated recombinant human TF (PPP reagent low, Diagnostica Stago, Asnieres, France). TF quantitation was expressed as pM of TF for 10 000 monocytes / well.

### **2.10. TNF- $\alpha$ , IL-10 and thrombin-antithrombin complex levels**

TNF- $\alpha$  and IL-10 concentrations after 24h incubation were measured in the supernatants by ELISA (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions, in conditioned media for monocytes or macrophages after 1 day or 8 days of incubation, respectively. Thrombin-antithrombin (TAT) complexes were measured by ELISA in the plasma after incubation of whole blood on the different surfaces for 1 or 5h, and according to the manufacturer's instructions (Siemens Healthcare diagnostics, Enzygnost TAT micro).

### **2.11. Mass spectrometry**

The bicinchoninic acid (BCA) assay was used to quantify the adsorbed protein on the material samples according to the manufacturer's protocol (Thermo Scientific), then a protein digestion was carried out with the following protocol: after incubation with plasma for 2 hours at 37°C, surfaces were briefly rinsed with 1% PBS solution. Adsorbed proteins were submitted to a proteolysis stage by applying a trypsin solution onto the material. The digestion was carried out overnight at 37°C with trypsin (Promega, Madison, WI), at a ratio of 1:10,

trypsin to protein. To stop the reaction with trypsin, the sample was treated with 50  $\mu\text{L}$  of 10% formic acid (FA). This step was followed by two washing steps with 100% acetonitrile (ACN) to collect peptides in separate Eppendorf tubes for the different materials. After evaporation, peptide solutions were then concentrated using ZipTips (Agilent Technologies, OMIX 96 C18 10  $\mu\text{L}$ ). Briefly, ZipTips were first equilibrated with 100% ACN, and then conditioned in 0.1% FA before sample loading. The unbound fraction was eluted by several washing steps (0.1% formic acid FA) followed by centrifugation. The bound peptides were then eluted using a 50% ACN, 50% FA 0.1% solution and centrifugation (2500 g for 5 min). This step was repeated 3 times. Peptide samples were concentrated by evaporation using a Speedvac, and finally dissolved in 10  $\mu\text{L}$  of 0.1% FA for nanochromatography. All experiments were carried out with a hybrid linear ion trap–orbitrap mass spectrometer (LTQ Orbitrap Elite, Thermo Scientific) equipped with a nano-ESI source and coupled to a liquid nano-chromatography system (Easy-nLC II, Thermo Scientific). Mass spectrometry Analysis, protein identification and quantification were performed according Oby A. and *al*, 2014 [39].

## **2.12. Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (San Diego, CA) and using an analysis of variance (ANOVA) or an independent samples t-test. Where appropriate, the statistical significance was reported for  $p < 0.05$ . All experiments were repeated in triplicate with three technical replicates for each experimental value.

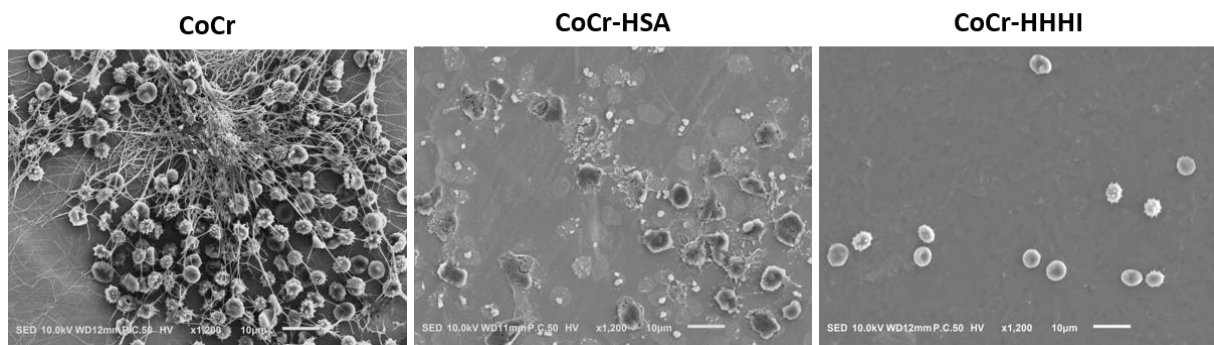
### **3. Results and Discussion**

#### **Thin films significantly reduce biomolecular and inflammatory cell activation, thrombin generation, and fibrin formation induced by CoCr in whole blood**

Cardiovascular medical devices that are used in direct contact with blood should have good blood compatibility and avoid activation of protein and platelet complexes, as well as minimize activation of immune sensitive processes that could catalyze the former. Foreign surfaces such as metallic substrates may activate blood cells leading to uncontrolled thrombotic and inflammatory responses that ultimately result in the failure of the implant [5]. It is therefore essential to limit the thrombogenicity of bare metal surfaces used as cardiovascular devices. One option involves the coating of bare metal surfaces with multi-functional polymers that are capable of minimizing the denaturation of key proteins that activate cellular elements and more specifically monocytes [30,32]. In this study, we have investigated the use of a novel polymer derived from a platform system, HHHI, for such a purpose as it can be formed into thin crosslinked films which mask the direct contact between the metal and the blood. These materials have been specifically shown to reduce monocytes activation. The end-point objective was to reduce the probability of monocyte activated thrombosis.

To evaluate the biological effect HHHI thin films on CoCr, well defined surfaces (CoCr (positive control), CoCr-HSA (negative control) and CoCr-HHHI) were incubated for 24h at 37°C with whole blood. Hemolysis is a detrimental event to the outcome of biomaterial implantation as it destroys erythrocytes that are abundant blood cells and are important for the transport of oxygen (O<sub>2</sub>) from the lung to all tissues and cells, as well as carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) from tissues back to the lung. They also play a pivotal role in enabling platelets to interact with surfaces in flow systems. We assessed hemolysis on the 3 different surfaces. No

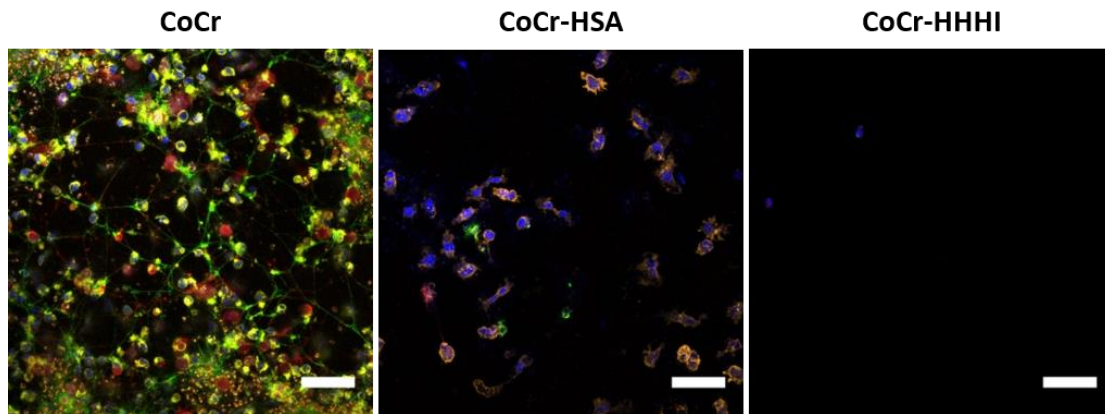
induction of hemolysis was observed for any of the experiments after the contact of whole blood (**Supplementary Figure S2**). When examining the whole blood contacted surfaces by SEM, the images (**Figure 1**) showed that an intense fibrin network was formed on the bare CoCr surface, with a large presence of platelets, leucocytes and red blood cells trapped within it. On the HSA passivated surface, no fibrin network was detected but the presence of what were likely activated platelets and leukocytes was observed. On HHHI-coated CoCr surfaces, very few cells were adherent, and among those found, the cells were mostly red blood cells.



**Figure 1:** Cell morphology after 24h incubation at 37°C of whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. SEM images are representative of 3 different experiments performed in triplicate with 3 different blood donors. Scale bar = 10 µm

The nature of the deposited blood elements was confirmed by immunostaining with specific antibodies against fibrin, platelets and leukocytes (**Figure 2 and Supplementary Figure S3**). The CoCr showed an extensive amount of fibrin, platelets and leukocytes whereas when these surfaces were coated with HSA (CoCr-HSA) the number of leukocytes and platelets were substantially reduced and only showed a few isolated fibrin domains. When CoCr was treated with thin films of HHHI, the adhesion of platelets was eliminated and no

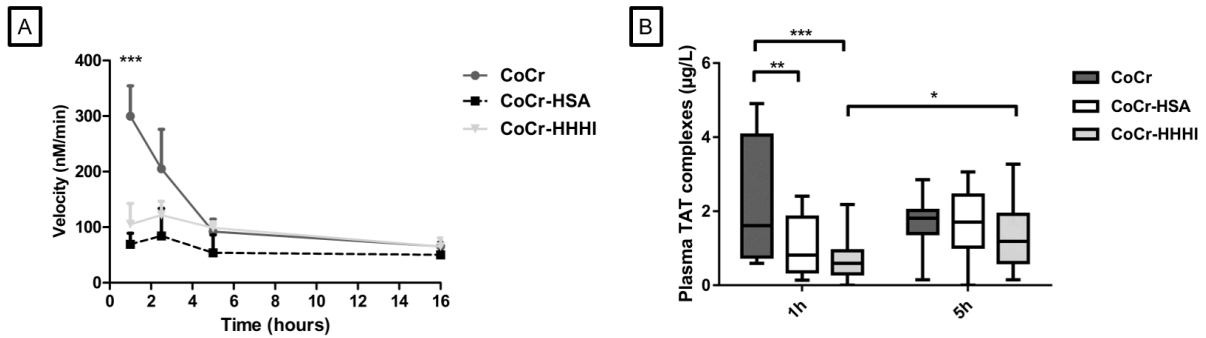
fibrin formation was seen. There were a few adherent leukocytes however their activated state was much less noticeable than either of the other two surfaces. Previous studies have shown that platelets and neutrophils were activated after CoCr contact [22,23]. However, the results of our current study show a global cell activation with extensive leukocyte mediated events, suggesting that anti-platelet therapy, which is often proposed after cardiovascular device implantation may not be sufficient to prevent all pathways that lead to clot formation, and specifically those occurring *via* leukocyte cell activation. The importance of this hypothesis is substantiated by a recent a multicenter European study [1], where it was shown that thrombi from patients with stent thrombosis were heterogenous in composition. One feature of these thrombi was the presence of numerous leukocytes suggesting an important role for inflammatory activity in the pathogenesis of stent thrombosis events.



**Figure 2:** Immunostaining after 24h of incubation of whole blood at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. Confocal microscopy images are representative images of 2 different experiments performed in triplicate with 2 different blood donors. Cell nuclei (blue), fibrin (green), platelets (red) and leukocytes (yellow). Scale bar = 50 µm.

The formation of a fibrin network on bare CoCr indicates that coagulation is activated. This activation of coagulation may be partially mitigated with HSA coating of CoCr; however, it is clear that the presence of HSA has a limited ability to remain at the surface and block leukocyte activation and the formation of fibrin networks, as these complexes are still clearly evident on the CoCr-HSA substrates. In contrast, the HHHI coatings appear to completely prevent the activation of coagulation and fibrin networks, as it mitigates cell adhesion and subsequently cell activation. This is an impressive outcome when considering that the materials do not inherently possess any pharmaceutical anticoagulant function, and they solely achieve this outcome based on the unique multi-function chemistry and its interaction with the blood elements. Previous studies have shown that HHHI based materials are potent disruptors of monocyte activation. This feature was previously described to be achieved by enabling reduced denaturation of key proteins known to activate these cells, *e.g.* fibronectin and immuno-globulin G [30,31].

In order to quantify the activation of coagulation in whole blood induced by the different surfaces, we have measured thrombin generation. Thrombin is the key enzyme that allows the conversion of fibrinogen to fibrin in order to form a clot, but it also plays a role in inflammation [40] and the activation of complement factors [41]. In this study, we have measured thrombin generation in whole blood using an adapted global test: the Calibrated Automated Thrombogram (CAT). This technique allowed for thrombin detection despite the presence of red blood cells [37]. As shown on **Figure 3A**, the velocity of thrombin generation at 1h was significantly ( $p < 0.001$ ) higher on CoCr ( $299 \pm 54$  nM/min) as compared to CoCr-HHHI ( $105 \pm 37$  nM/min). With respect to the kinetics of thrombin generation, the velocity on CoCr was decreased at a value similar to the 2 other surfaces only after 5h. Similar results were obtained when Endogenous Thrombin Potential (ETP) was assessed (**Supplementary Figure S4A and B**).



**Figure 3:** Thrombin generation and TAT complexes in whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. A) Kinetic of thrombin generation (CAT) at 1h, 2.5h, 5h and 16h of incubation at 37°C. n=2-4, triplicates with 2-4 different blood donors, Mean  $\pm$  SD, \*\*\*p<0.001. B) Quantification (ELISA) of Thrombin/Antithrombin complexes in plasma after 1h or 5h of whole blood incubation at 37°C. n=6, triplicates with 6 different blood donors, Medians and quartiles, \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01 and \*p < 0.05.

Importantly, the activation of coagulation in whole blood was substantially different among the different surfaces (**Figure 3B**) as evaluated by the amount of thrombin/antithrombin (TAT) complex using the enzyme immunoassay. In agreement with the thrombin generation observed in whole blood, the level of TAT complex, reflecting activation of the coagulation, was higher on bare CoCr ( $2.2 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ ) after 1h of whole blood incubation when compared to the HSA coated surfaces with a significant (at  $p < 0.05$ ) 2-fold reduction ( $1.1 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ ). The level of TAT complexes was reduced by almost 3-times in the presence of the HHHI coatings ( $0.7 \pm 0.1 \mu\text{g/L}$ ). After 5h of whole blood incubation, the level of TAT complex was similar for all surfaces. This may be explained by an enzymatic degradation or dissociation of the complexes in this static test.

Under healthy physiological conditions, endothelial cells provide an anticoagulant and antithrombotic barrier which is in direct contact with blood [42]. Vascular homeostasis is maintained through the release of numerous vasodilatory and vasoconstrictive substances from the endothelium, and by surface proteins expressed by endothelial cells, such as thrombomodulin and heparin-like molecules, which exhibit antithrombotic actions through defined pathways. In particular, heparin-like molecules act as cofactors for antithrombin which contributes to the antithrombotic properties of the endothelium [43]. Bare CoCr is a foreign surface that does not have the ability to exhibit the properties of the endothelium as demonstrated by the observed thrombin generation, confirmed from the increased level of TAT complexes, both reflecting the activation of coagulation. The HHHI coatings prevents the burst in coagulation activation observed with CoCr. The presence of activated platelets and leukocytes and the formation of an important fibrin network at the surface of bare CoCr confirm the observation that this metal is procoagulant and that blood contact with this metallic substrate can initiate thrombus formation, whereas the HHHI coating on CoCr prevents thrombin generation and fibrin formation.

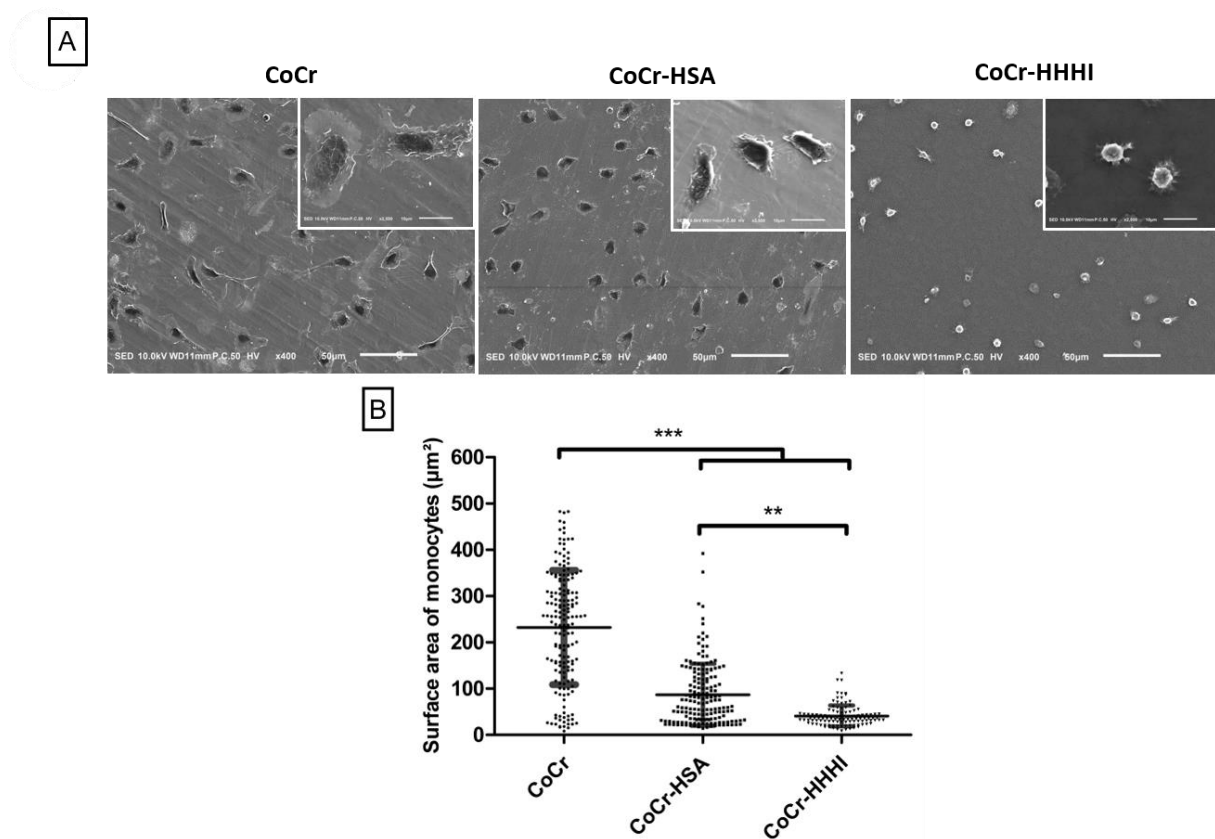
**Reduction of tissue factor generated by monocytes activation is a key biomolecular factor in the reduction of thrombin generation on CoCr coated with HHHI thin films**

The initiation of clotting involves a highly interconnected mechanism of activated molecular sequences, where the intrinsic pathway of coagulation, initiated by the contact of blood proteins, and the extrinsic pathway, initiated by TF, converge into the common pathway resulting in platelet activation that accelerates thrombin formation and allows the formation of a fibrin rich clot [5]. Activation of the extrinsic pathway is TF-dependent and monocytes can provide a major source of TF in blood [10]. They are able, after activation, to express TF at



their membrane. Membrane-associated TF is fully active and able to initiate the coagulation cascade. Moreover, its activity is largely increased in the presence of negatively charged phospholipids such as phosphatidyl serine [44]. Thus, given the high level of adherent leukocytes shown in **Figure 2** on CoCr surfaces, it was hypothesized that TF expression by monocytes is likely to be implicated in some manner with respect to the activation of coagulation observed on CoCr in whole blood. Moreover, a previous study has shown the importance of leukocytes and more particularly of monocytes in triggering coagulation, in addition to the more traditional studied pathways involving platelets on biomaterial surfaces [45]. These studies showed that the quantity of TAT complex formation was almost negligible in platelet poor plasma (PPP) or platelet rich plasma (PRP) when compared to whole blood, therefore potentially implicating the importance of leukocytes [45]. To support this hypothesis, we purified monocytes and then incubated them on the different surfaces and tested for cell adhesion, thrombin generation in PFP, TF activity and cytokine release. Macrophage adhesion and their cytokine release were also investigated. Monocytes were first incubated at 37°C for 24h on different surfaces (CoCr, CoCr-HSA and CoCr-HHHI). No differences in cell mortality were observed on the different surfaces as shown by the LDH data (**Supplementary Figure S5A**). Monocyte morphology was observed by SEM (**Figure 4A**). Monocyte activation after adhesion can be evaluated, in part, by the morphology of these cells *i.e.* increase of the cell size, cytoplasmic propagation and presence of pseudopodia which are markers of activation [46]. On the CoCr surface, monocytes were very spread with a strong presence of pseudopodia suggesting activation. Spreading and pseudopodia were less important on CoCr-HSA whereas monocytes on CoCr coated with HHHI were very small, round with a low presence or absence of pseudopodia suggesting low monocyte activation on CoCr coated with thin films as compared to bare CoCr. By measuring monocyte surface area (**Figure 4B**) we have observed a significant ( $p < 0.001$ ) increase (4x) of the cell surface area on

CoCr as compared to HHHI-coated CoCr ( $232 \pm 123 \mu\text{m}^2$  for CoCr vs  $40 \pm 23 \mu\text{m}^2$  for HHHI). In the presence of HSA, the surface area of monocytes was also significantly reduced as compared to CoCr but was still significantly increased, almost twice, when compared to HHHI-coated CoCr. According to their morphology, monocytes were therefore much less activated on the PU-coated CoCr as compared to CoCr and even CoCr-HSA.

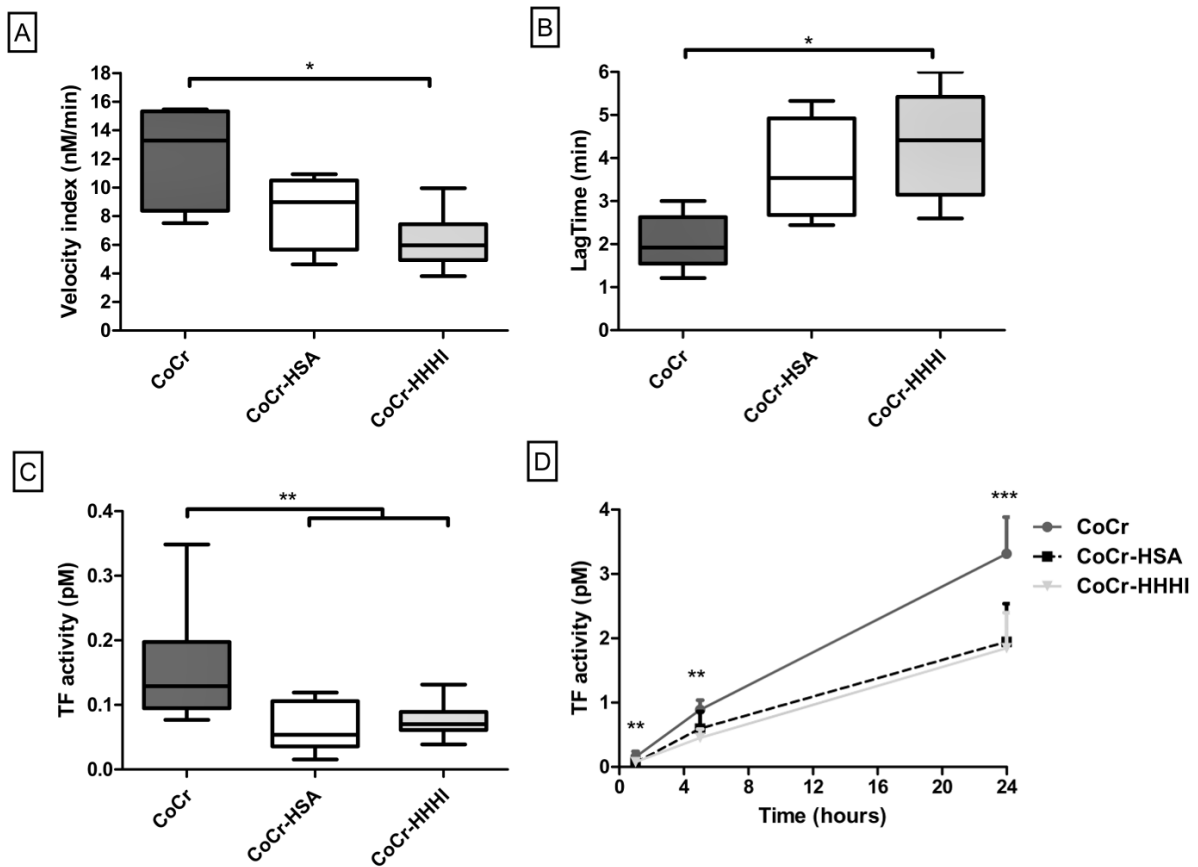


**Figure 4:** Morphology of isolated monocytes after 24h of incubation at 37°C on bare CoCr,

CoCr coated with HSA or HHHI. A) SEM images are representative of 3 different experiments performed in triplicate with 3 different blood donors. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  (inset). B) Measurement of surface area from SEM images. Each point represents the surface area of one monocyte. 18 images were measured per conditions. Mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$ .

0.001 and \*\* $p < 0.01$ .

To confirm that the changes in cell morphology were related to cell activation, and to determine the implication of monocytes in the activation of coagulation observed in whole blood, the pro-coagulant activity of monocytes was investigated through the measurement of thrombin generation at the cell surface. As shown on **Figure 5A**, the velocity index, reflecting the initiation and amplification phases of coagulation, was significantly ( $p < 0.05$ ) increased by 2x on CoCr as compared to the HHHI-coated CoCr ( $12.2 \pm 3.4$  nM/min for CoCr vs  $6.3 \pm 2.1$  nM/min for HHHI). In the presence of HSA, the velocity index had an intermediate value to the above two states ( $8.2 \pm 2.3$  nM/min), with no significant difference compared to either CoCr or CoCr-HHHI. The time required to produce the first traces of thrombin (LagTime) that would allow for the amplification of the coagulation was significantly ( $p < 0.05$ ) lower for the CoCr surface as compared to HHHI-coated CoCr ( $2.1 \pm 0.6$  min vs  $4.3 \pm 1.3$  min respectively) (**Figure 5B**). Again, the HSA coated CoCr displayed a LagTime value that was intermediate and not significantly different from those of CoCr or CoCr-HHHI. These results suggest that thin films of HHHI delay the initiation of thrombin generation and reduce the level of thrombin generated and thus globally reduce the CoCr-induced pro-thrombotic phenotype of monocytes. Supporting this hypothesis was the observation that the correlation coefficients between monocyte surface area, LagTime and Velocity index were highly significant ( $r^2 = 0.999$  for monocyte surface vs LagTime and  $r^2 = 0.989$  for monocyte surface vs velocity index). The observed effect on thrombin generation is mainly due to an effect of the monocyte, as no significant difference was observed between the materials when only PPP was used in the assay (**Supplementary Figure S6**).



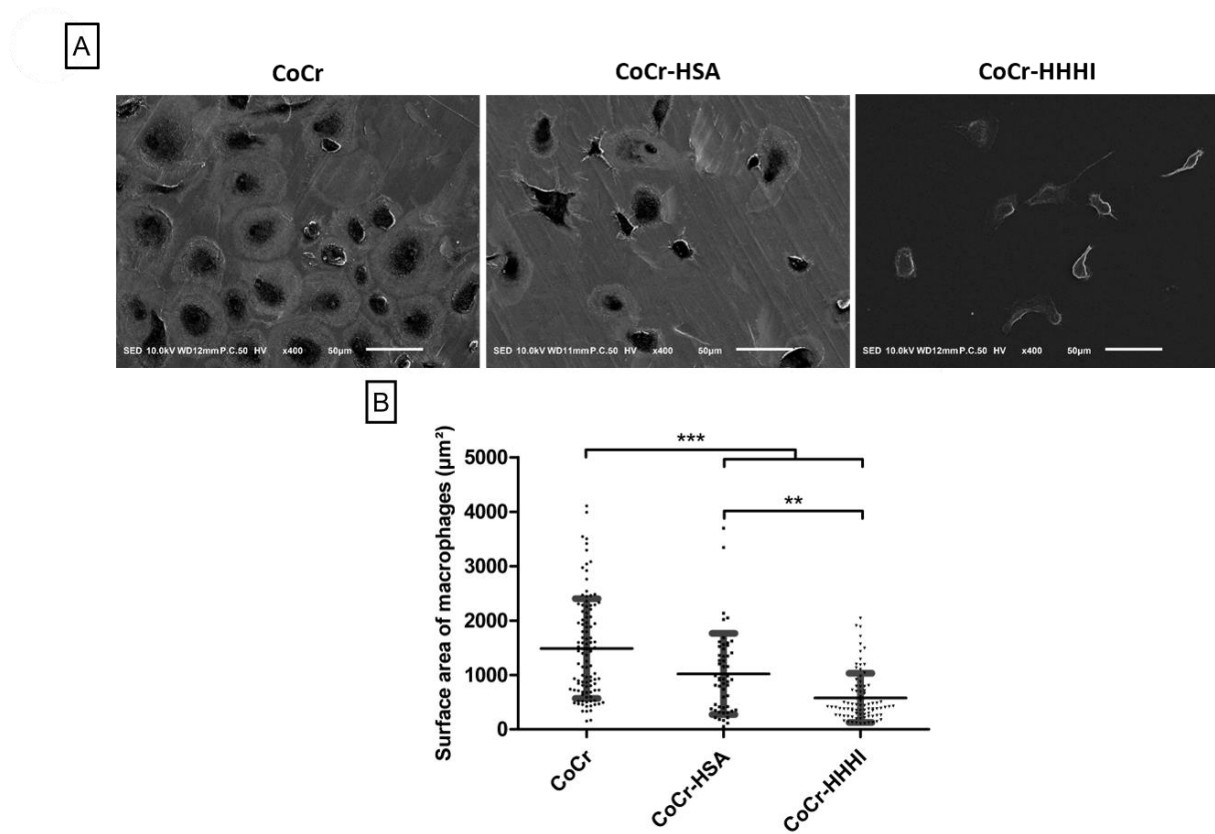
**Figure 5:** Thrombin generation and TF activity of isolated monocytes incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. A - B) Thrombin generation (CAT): Velocity index (A) and Lagtime (B) after 24h of incubation at 37°C. n=6, triplicates with 6 different blood donors, Mean  $\pm$  SD, \*p<0.05. C-D) TF activity after 1h of incubation (C) and Kinetic at 1h, 5h et 24h of incubation at 37°C (D). n=5, triplicates with 5 different blood donors, Medians and quartiles (A, B and C) and Mean  $\pm$  SD (D). \*\*\*p < 0.001 and \*\*p < 0.01.

As the LagTime parameter for thrombin generation is highly dependent with the level of TF [47], monocyte TF activity was evaluated (**Figure 5C and D**). TF activity was measured at the surface of intact cells as a function of time. As early as the 1h time point

(**Figure 5C**), TF activity was significantly ( $p < 0.01$ ) increased for monocytes in contact with the CoCr surface ( $0.2 \pm 0.1$  pM) as compared to the HHHI-coated CoCr ( $0.7 \pm 0.02$  pM) or HSA ( $0.7 \pm 0.03$  pM). Over time (5 and 24h) (**Figure 5D**), CoCr-induced TF activity is still induced at 2x higher than when compared to PUs-coated CoCr or HSA.

As NF- $\kappa$ B activation has been shown to be involved in TF gene transcription, we have looked at NF- $\kappa$ B translocation into the monocyte's nuclei (**Supplementary Figure 7**). We observed a high NF- $\kappa$ B activation after 1 hour for monocyte contact with CoCr or CoCr-HSA. In contrast, only a faint NF- $\kappa$ B activation was observed after contact with CoCr-HHHI. These results could explain the differences that were observed in TF expression induced by the different surface at latter times (5 and 24h). It was interesting to see that even after a short period of 1 hour of contact with CoCr, monocytes were able to display a significant level of TF activity. This activity could not be explained by the generation of new protein synthesis as the latter would require at least 4h or more, even if the TF gene is an early response gene (mRNA synthesized in 1 to 2h) [7]. It has been reported that approximately 1.5% of human monocytes express low levels of intracellular [48] or membrane encrypted TF [49] in resting conditions. We can hypothesize that monocyte TF activity from cells on the surface of CoCr is then likely due in large part to the early activation of the already present, but encrypted TF immediately following contact with CoCr, and/or that TF activity may be increased by the translocation of negatively charged phospholipids on the external cell membrane of activated monocytes [50]. CoCr is known to oxidize at its surface, and the oxide by-products carry a negative charge at physiological conditions (neutral pH). Such negative charged species have been reported to contribute which to TF activation [51–53]. When monocytes are recruited to the site of biomaterial implantation, they will evolve into macrophages that could secrete pro-

inflammatory and/or pro-wound-healing cytokines and growth factors that influence subsequent healing events, and can contribute to the eventual fate of the implanted biomaterial [54]. To study macrophage behavior, monocytes were incubated for 8 days on the different surfaces, allowing them to reach the supposed state of differentiation in macrophages [55]. The morphology of macrophages was observed by SEM (**Figure 6A**). On a CoCr surface, the macrophages had the appearance of a fried egg (about 10 times the size of the monocytes on the same surfaces), highly spread with a strong presence of pseudopodia. This was not observed on HHHI-coated CoCr. An intermediate phenotype was found on the HSA coated CoCr. Macrophage surface area was significantly ( $p < 0.001$ ) increased 3-times on CoCr as compared to the HHHI-coated CoCr ( $1519 \pm 978 \mu\text{m}^2$  for CoCr vs  $578 \pm 451 \mu\text{m}^2$  for HHHI) (**Figure 6B**). For HSA the surface area was  $1020 \pm 738 \mu\text{m}^2$ . According to their morphology, macrophages were therefore much less activated on PU-coated CoCr as compared to CoCr and even CoCr-HSA. Looking at the morphology of macrophages, it seems that they tended to fuse with each other. One hypothesis was that the phenomenon of foreign body giant cells (FBGC) could occur with a longer incubation time. FBGC are formed when the foreign body exceeds the capacity of a single macrophage to internalize foreign objects. Macrophages adhering to the biomaterials will fuse and form a large multi-nuclei cell to try to remove the foreign body [56,57].



**Figure 6:** A) Morphology of isolated macrophages after 8 days of incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. A) SEM were representative images of 3 different experiments performed in triplicate with 3 different blood donors. Scale bar = 50 µm. B) Measurement of surface area from SEM images. Each point represents the surface area of one monocyte. 18 images were measured per conditions. Mean ± SD. \*\*\*p < 0.001 and \*\*p < 0.01.

**Thin films of multi-functional HHHI coatings significantly reduce the CoCr-induced release of the pro-inflammatory cytokine TNF-α by monocytes/macrophages**

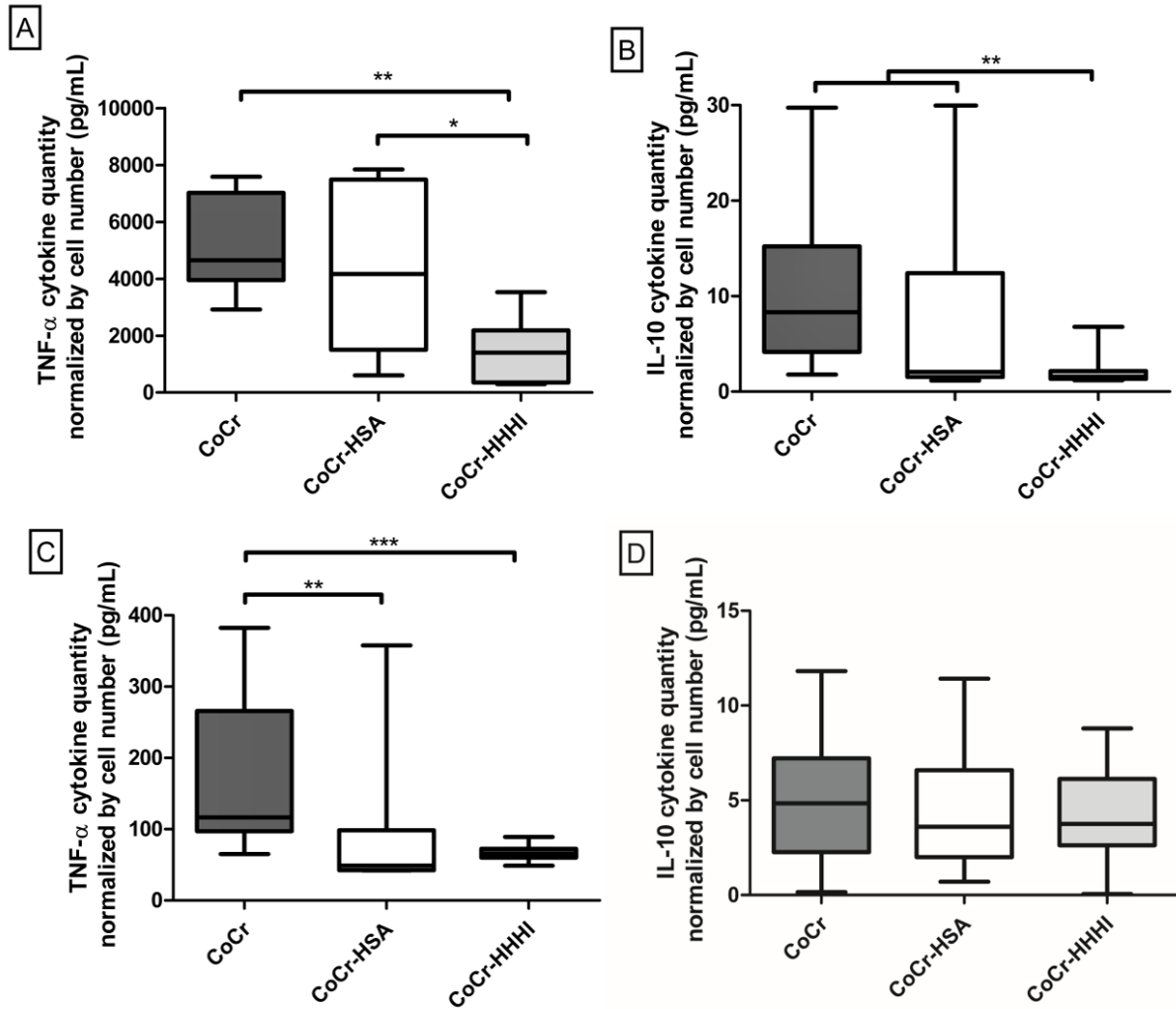
The extent of the inflammatory response induced by the biomaterial can be evaluated in terms of specific pro-inflammatory cytokines released from adherent monocytes/macrophages such as tumor necrosis factor (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) or IL-12

and anti-inflammatory cytokines such as IL-10 [58,59]. In particular, TNF- $\alpha$  release is an important indicator of monocyte activation because it is a potent inflammatory cytokine that can activate virtually all cells [60] and is implicated in inflammation and tissue destruction in chronic inflammatory diseases [61].

To evaluate the pro- or anti-inflammatory state of monocytes and macrophages after contact with the different biomaterials, the secretion of the pro-inflammatory cytokine, TNF- $\alpha$ , and of the anti-inflammatory cytokine IL-10 were measured in the 24h culture supernatant after 8 days of monocyte incubation (**Figure 7**). The results were normalized by cell quantification performed using the LDH assay (**Supplementary Figure S5A and B**). On CoCr, the level of TNF- $\alpha$  secreted by monocytes (**Figure 7A**) was 5 times higher ( $p < 0.01$ ) than on the HHHI-coated CoCr ( $5229 \pm 138 \mu\text{g/ml}$  for CoCr vs  $1435 \pm 111 \mu\text{g/mL}$  for HHHI). A significant difference ( $p < 0.05$ ) between HHHI-coated CoCr and HSA in TNF- $\alpha$  secretion was also observed but there was no statistical difference between HSA and CoCr. The secretion of IL-10 (**Figure 7B**) was also largely enhanced after CoCr or HSA contact when compared to HHHI-coated CoCr ( $10.6 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$  for CoCr vs  $2.3 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$  for HHHI). On CoCr or CoCr-HSA, monocytes secreted a large amount of pro- and anti-inflammatory cytokines suggesting a strong activation of the cells that is sequestered by the unique chemistry of the HHHI thin films coatings as in this condition the level of secreted cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-10) was low. These results were aligned with our observations on cell morphology and procoagulant activity. Macrophages on CoCr also exhibited more than 2-times increase ( $p < 0.001$ ) in TNF- $\alpha$  secretion (**Figure 7C**) when compared to HHHI-coated CoCr ( $167 \pm 8.5 \mu\text{g/mL}$  for CoCr vs  $66 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$  for HHHI). On HSA, TNF- $\alpha$  secretion was not different when compared to PU-coated CoCr. IL-10 secretion was similar on all surfaces (**Figure 7D**). The overall conclusion is that the interaction of



monocytes/macrophages with thin films of HHHI limits their activation resulting in a modification of their inflammatory phenotype.



**Figure 7:** Quantification (ELISA) of TNF- $\alpha$  and IL-10 in the 24h supernatant of monocytes (A-B) and macrophages (C-D) incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI.

Results are normalized by cells quantity. n=6, duplicates with 6 different blood donors,

Medians and quartiles, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 and \*p<0.05.

Previous studies have shown that activated monocytes (endotoxins, immune complexes, monocyte chemotactic protein (MCP-1) or TNF- $\alpha$ ) are able to induce the expression of TF [62,63]. Moreover, plasmatic TF antigen has been shown to be correlated with the expression of TNF- $\alpha$  and MCP-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension [64]. The observed secretion of TNF- $\alpha$  by monocytes or macrophages in contact with CoCr may explain the TF activity measured at latter times (5h and 24h), values that remain 2x higher than that measured on the other surfaces.

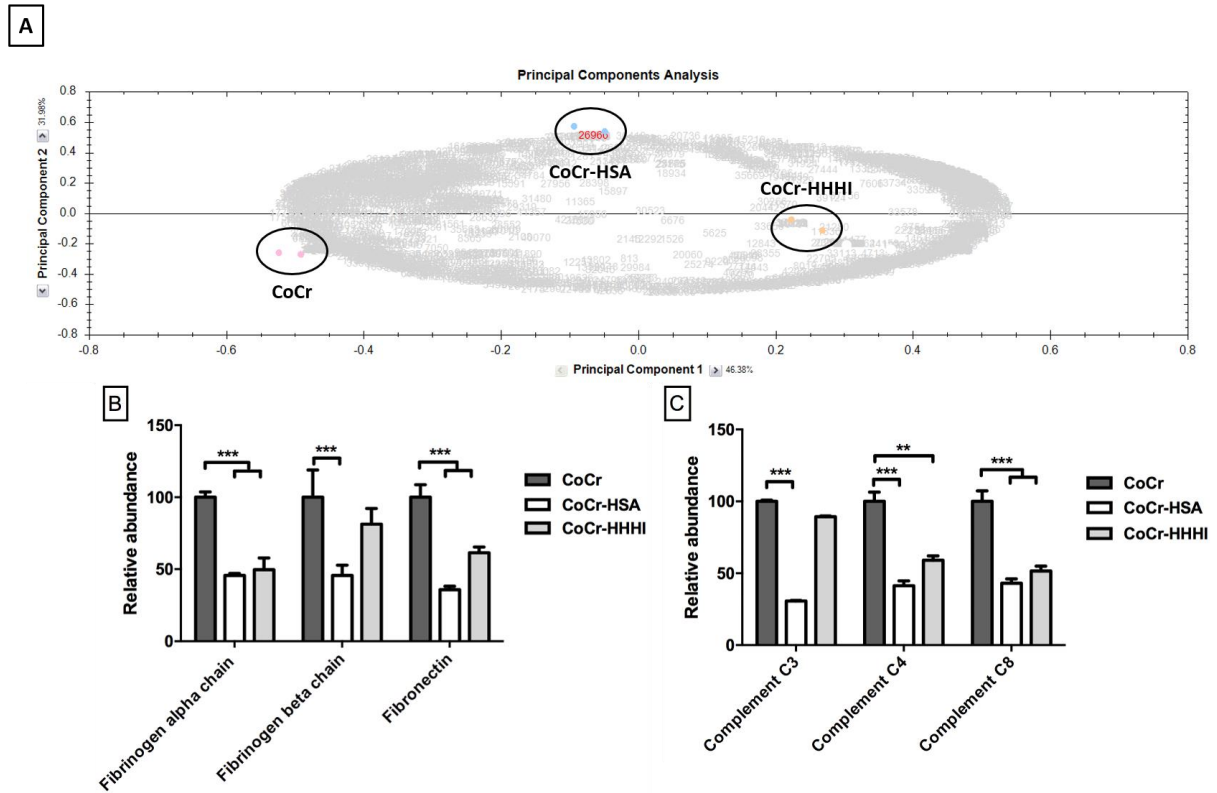
Many recent reports have focused on the controlled release of bioactive molecules to reduce inflammation and improve tissue repair. For example, to treat local inflammation, a study has used a chitosan hydrogel loaded with anti-TNF- $\alpha$  antibodies [65]. Matrices formed on the biomaterial surface were reported to be rich in cytokines, growth factors and chemoattractants. This favors the recruitment of innate immune system cells to the site of injury [55]. Therefore, it is important to minimize TNF- $\alpha$  secretion. HHHI therefore has a considerable advantage with regards the low level of TNF- $\alpha$  secreted by monocytes on this surface.

Surface chemistry appears to potentially play a contributing role in the activation of adherent leukocytes [66]. More specifically, the behavior of monocytes/macrophages and whole blood is differentiated according to the surface chemistry, as in this study we controlled for surface roughness [34]. In this work, we observed that 5  $\mu$ m thick thin films on the surface of CoCr could modulate the cellular response. We recently have shown [34] that the differential adsorption of two plasma proteins, IgG and fibronectin, were observed on the CoCr vs CoCr-HHHI surfaces. The exposure of the Fab fragment from IgG was significantly higher on CoCr when compared CoCr coated with the PU. Exposure of IgG is a critical factor shown to increase monocyte adhesion and propagation [31,33]. Regarding human plasma

fibronectin, exposure of the cell binding domains (CBD) and N-terminal domain was significantly increased by 4x on CoCr as compared to CoCr surfaces coated with HHHI. The CBD contains the amino acid sequences RGD and PHSRN. The potential synergy between these two sequences favors the fusion of macrophages to form foreign body giant cells (FBGC) [67] and activates monocytes through the VLA-5 receptor, inducing the production of proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  [68]. The N-terminal domain and more particularly the 70 kDa fragments of Fn play an important role in coagulation. This latter domain contributes to cross-linking activity within fibrin clots by the formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)-lysyl bonds, and is catalyzed by the thrombin-activated coagulation factor XIII (FXIIIa, plasma transglutaminase) [69]. This cross-linking increases both thrombus size and platelet adhesion [70]. All these observations suggest that the surface chemistry of the HHHI coatings may be controlling thrombin formation indirectly *via* multiple pathways that are mediated, in part, by monocytes, and that harnessing this relatively simple multifunctional polymer chemistry in a manner that reduces monocyte activation appears to be in part influenced by the nature of protein adsorption [71], which in turn has been shown to influence the degree of adhesion and activation of monocytes and macrophages, as well as the secretion of cytokines. The latter in turn could propagate the generation of TF, and thus produce TAT and clot formation.

It is well known that the adsorbed protein layer onto a biomaterial surface is of particular importance for subsequent events and may condition cell behavior [55]. Therefore, in order to gain a further understanding with respect to the mechanisms occurring on the surface of these different materials, an analysis of the adsorbed proteins was carried out by mass spectrometry after adsorption of PPP for 2h at 37 ° C. Principal component analysis (PCA) was used to evaluate the capacity for the different surfaces to show a relative abundance of different adsorbed proteins (**Figure 8A**). In this analysis, the two first

components of the PCA explain nearly 80 % of the total variability. Principal component 1, which accounts for 46 % of the total diversity, allows one to discriminate between bare CoCr and CoCr coated with HHHI. The finding of differences on these surfaces would signal the extent of distinctiveness in terms of protein adsorption. Not surprisingly, the CoCr-HSA surface is discriminated from the other surfaces in the second component because of the presence of HSA which accounts for another 32 % of the analyzed proteins. At a more focused level, the relative abundances of two subsets of proteins are presented (**Figure 8B and 8C**). **Figure 8B** shows that fibrinogen (Fg) alpha chain/beta chain and Fn proteins are presented at a higher relative abundance on CoCr surfaces, while a rather low level was present on CoCr-HSA surface, and an intermediate level was found for HHHI. The low level of adsorbed proteins on the CoCr-HSA may be in part explained by the presence of HSA protein that prevented access of other proteins from interacting with the surface. With respect to complement system proteins, *e.g.* C3, C4 and C8, the profiles are highly comparable to what was displayed in **Figure 8C**. Note that many other proteins have been identified but only a few differentially detected proteins were reported on here, as they are known to have a role in coagulation and / or inflammation. Specifically, Fg was shown to be actively involved in neutrophil adhesion [72], to lead to activation of the procoagulant state in platelets [73] and to promote the monocytes adhesion [74]. Fn is known to have a role in coagulation by consolidating the fibrin clot [69] and inflammation by activating monocytes [68]. Fn, as is Fg, is also known to activate platelets [73]. C3 complement protein is known to have a role in monocyte adhesion [75]. Monocytes and neutrophils have receptors for complement products (C3a, C4a, C5a) which leads to their activation [76,77]. These latter results related to the complement system were very interesting and provide an alternative perspective in regards to studying the reactivity of the blood cells in contact with the PUs investigated here.



**Figure 8:** Principal components analysis (PCA) and compared relative abundance of specific proteins by mass spectrometry on the different surfaces (bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI) after 2h of incubation of PPP. A) Graphical representations of the PCA results (principal components 1 and 2). B) Illustration of relative quantification for proteins fibrinogen alpha chain, beta chain and fibronectin and C) complement C3, complement C4, complement C8. The results are presented as mean  $\pm$  SEM. CoCr was used as a reference material and considered as a 100%. n=3, duplicate with pool of 18 different blood donors.

Mean  $\pm$  SEM, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01 and \*p<0.05.

#### **4. Conclusion**

There is a need for establishing effective biomaterials in the area of medical cardiovascular devices, and this is driving the scientific community to improve the blood and tissue compatibility of these biomaterials. The strategy identified in this study focused on applying multifunctional thin film polyurethane coatings onto metal surfaces in order to neutralize its pro-thrombotic and inflammatory properties. This study highlighted that thin films of HHHI coated on CoCr circumvent the fibrin network formation associated with whole blood interaction with CoCr substrates, without the need for any anticoagulant adjuvants. In particular, the expression of TF by monocytes after contact with CoCr could be responsible for the initiation of coagulation and this phenomenon should become a more mainstream consideration in the evaluation of other blood contacting biomaterials. In the current work this pathway is impaired by the HHHI coatings that reduce the pro-thrombotic and pro-inflammatory phenotype of monocytes and macrophages induced by CoCr.

#### **Acknowledgements**

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada Synergy grant, French ministry of research (MENESR) and FFCR grant. The authors would like to acknowledge the contribution of Dr. Kyle Battiston from the University of Toronto, who provided the DVO materials to synthesize the HHHI polymers.

#### **Data availability**

The raw data and the processed data required to reproduce these findings are available upon request to the corresponding author.

## References

- [1] J. Riegger, R. Byrne, M. Joner, S. Chandraratne, A. Gershlick, J. Ten Berg, T. Adriaenssens, G. Guagliumi, T. Godschalk, F. Neumann, D. Trenk, L. Feldman, P. Steg, W. Desmet, F. Alfonso, A. Goodall, R. Wojdyla, D. Dudek, V. Philippi, S. Opinaldo, A. Titova, N. Malik, J. Cotton, D. Jhagroe, A. Heestermans, P. Sinnaeve, P. Vermeersch, C. Valina, C. Schulz, A. Kastrati, S. Massberg, Histopathological evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: a report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium, *Eur. Heart J.* 37 (2016) 1538–49.
- [2] B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* (2013). doi:10.1038/nri3345.
- [3] L.L. Swystun, P.C. Liaw, The role of leukocytes in thrombosis, *Blood.* 128 (2016) 753–762. doi:10.1182/blood-2016-05-718114.
- [4] K. Ekdahl, Y. Teramura, O. Hamad, S. Asif, C. Duehrkop, K. Fromell, E. Gustafson, J. Hong, H. Kozarcanin, P. Magnusson, M. Huber-Lang, P. Garred, B. Nilsson, Dangerous liaisons: complement, coagulation, and kallikrein/kinin cross-talk act as a linchpin in the events leading to thromboinflammation, *Immunol Rev.* 274 (2016) 245–269.
- [5] M.B. Gorbet, M. V. Sefton, Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes, *Biomaterials.* 25 (2004) 5681–5703. doi:10.1016/B978-008045154-1.50025-3.
- [6] J. Anderson, Inflammatory Response to Implants, *ASAIO J.* 34 (1988) 101–107. doi:10.1097/00002480-198804000-00005.
- [7] S.A. Gregory, J.H. Morrissey, T.S. Edgington, Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin., *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2752–5. doi:10.1128/MCB.9.6.2752.Updated.
- [8] T.A. Drake, J. Cheng, A. Chang, F.B. Taylor, Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis., *Am. J. Pathol.* 142 (1993) 1458–70. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684196><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1886910>.
- [9] M. Bode, N. Mackman, Regulation of tissue factor gene expression in monocytes and endothelial cells: Thromboxane A2 as a new player, *Vascul. Pharmacol.* (2014). doi:10.1016/j.vph.2014.05.005.
- [10] S. Grover, M. Mackman, Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis., *Arter. Thromb Vasc Biol.* 38 (2018) 709–725.
- [11] J. Chung, N. Gikakis, K. Rao, T. Drake, R. Colman, L. Edmunds, Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation, Circulation.* 93 (1996) 2014–2018.
- [12] M. Ernofsson, S. Thelin, A. Siegbahn, Monocyte tissue factor expression, cell activation, and thrombin formation during cardiopulmonary bypass: a clinical study., *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* (1997). doi:10.1016/S0022-5223(97)70373-8.

- [13] N. Mackman, R.E. Tilley, N.S. Key, Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2007). doi:10.1161/ATVBAHA.107.141911.
- [14] Y. Kamikubo, G.L. Mendolicchio, A. Zampolli, P. Marchese, A.S. Rothmeier, J.N. Orje, A.J. Gale, S. Krishnaswamy, A. Gruber, H. Østergaard, L.C. Petersen, W. Ruf, Z.M. Ruggeri, Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex, *Blood*. (2017). doi:10.1182/blood-2017-02-767079.
- [15] B.N. Brown, R. Londono, S. Tottey, L. Zhang, K.A. Kukla, M.T. Wolf, K.A. Daly, J.E. Reing, S.F. Badylak, Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials, *Acta Biomater.* 8 (2012) 978–987. doi:10.1016/j.actbio.2011.11.031.
- [16] B.N. Brown, B.D. Ratner, S.B. Goodman, S. Amar, S.F. Badylak, Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine, *Biomaterials*. 33 (2012) 3792–3802. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.034.
- [17] W.G. Brodbeck, Y. Nakayama, Y. Matsuda, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson, Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro, *Cytokine*. 18 (2002) 311–319.
- [18] S.K. Jaganathan, E. Supriyanto, S. Murugesan, A. Balaji, M.K. Asokan, Biomaterials in cardiovascular research: Applications and clinical implications, *Biomed Res. Int.* (2014). doi:10.1155/2014/459465.
- [19] C. Chen, C. Yao, J. Yang, D. Luo, X. Kong, S.M. Chung, I.S. Lee, Biomimetic apatite formed on cobalt-chromium alloy: A polymer-free carrier for drug eluting stent, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 151 (2017) 156–164. doi:10.1016/j.colsurfb.2016.12.021.
- [20] J.R. Davis, *Metals Handbook*, Met. Handb. (1998) 2571. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [21] A. Marti, Cobalt-base alloys used in bone surgery, *Injury*. 31 (2000) D18–D21. doi:10.1016/S0020-1383(00)80018-2.
- [22] V. Ollivier, C. Roques, N. Receveur, M. Gratz, L. Feldman, D. Letourneur, C. Gachet, P.H. Mangin, M. Jandrot-Perrus, Bioreactivity of stent material: Activation of platelets, coagulation, leukocytes and endothelial cell dysfunction in vitro, *Platelets*. 28 (2017) 529–539. doi:10.1080/09537104.2016.1252836.
- [23] E. Thirupathi, M.K. Larson, G. Mani, Surface modification of CoCr alloy using varying concentrations of phosphoric and phosphonoacetic acids: Albumin and fibrinogen adsorption, platelet adhesion, activation, and aggregation studies, *Langmuir*. 31 (2015) 358–370. doi:10.1021/la5038712.
- [24] J.P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R.S. Labow, Understanding the biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials*. 26 (2005) 7457–7470. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.079.
- [25] J. Guan, K.L. Fujimoto, M.S. Sacks, W.R. Wagner, Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications, *Biomaterials*. 26 (2005) 3961–3971. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.10.018.



- [26] J.J. Stankus, J. Guan, K. Fujimoto, W.R. Wagner, Microintegrating smooth muscle cells into a biodegradable, elastomeric fiber matrix, *Biomaterials*. 27 (2006) 735–744. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.06.020.
- [27] S. Sharifpoor, R.S. Labow, J.P. Santerre, Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Biomacromolecules*. 10 (2009) 2729–2739. doi:10.1021/bm9004194.
- [28] L.R. McDonald SM, Matheson LA, McBane JE, Kuraitis D, Suuronen E, Santerre JP, Use of monocyte/endothelial cell co-cultures (in vitro) and a subcutaneous implant mouse model (in vivo) to evaluate a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *J Cell Biochem*. 112(12):37 (2011). doi:10.1002/jcb.23307.
- [29] J.W.C. Cheung, D. Jain, C.A.G. McCulloch, J.P. Santerre, Pro-Angiogenic Character of Endothelial Cells and Gingival Fibroblasts Cocultures in Perfused Degradable Polyurethane Scaffolds, *Tissue Eng. Part A*. 21 (2015) 1587–1599. doi:10.1089/ten.tea.2014.0548.
- [30] K.G. Battiston, R.S. Labow, J.P. Santerre, Protein binding mediation of biomaterial-dependent monocyte activation on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *Biomaterials*. 33 (2012) 8316–8328. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.014.
- [31] K.G. Battiston, B. Ouyang, E. Honarparvar, J. Qian, R.S. Labow, C.A. Simmons, J.P. Santerre, Interaction of a block-co-polymeric biomaterial with immunoglobulin G modulates human monocytes towards a non-inflammatory phenotype, *Acta Biomater*. 24 (2015) 35–43. doi:10.1016/j.actbio.2015.06.003.
- [32] A. Gossart, K.G. Battiston, A. Gand, E. Pauthe, J.P. Santerre, Mono vs multilayer fibronectin coatings on polar / hydrophobic / ionic polyurethanes : Altering surface interactions with human monocytes, *Acta Biomater*. 66 (2018) 129–140. doi:10.1016/j.actbio.2017.11.013.
- [33] C.R. Jenney, J.M. Anderson, Adsorbed IgG: A potent adhesive substrate for human macrophages, *J. Biomed. Mater. Res*. 50 (2000) 281–290. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(20000605)50:3<281::AID-JBM1>3.0.CO;2-5.
- [34] A. Gossart, A. Gand, V. Ollivier, M. Boissière, J.P. Santerre, D. Letourneur, E. Pauthe, Coating of cobalt chrome substrates with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: characterization and interaction with human immunoglobulin G and fibronectin, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 179 (2019) 114–120.
- [35] K.Y. Hui, E. Haber, G.R. Matsueda, Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen, *Science* (80-. ). (1983). doi:10.1126/science.6648524.
- [36] H. Hemker, P. Giesen, R. AlDieri, V. Regnault, E. de Smed, R. Wagenvoort, T. Lecompte, S. Béguin, The calibrated automated thrombogram (CAT): a universal routine test for hyper- and hypocoagulability, *Pathophysiol Haemost Thromb*. 32 (2002) 249–53.
- [37] M. Ninivaggi, R. Apitz-Castro, Y. Dargaud, B. De Laat, H.C. Hemker, T. Lindhout, Whole-blood thrombin generation monitored with a calibrated automated thrombogram-based assay, *Clin. Chem*. 58 (2012) 1252–1259. doi:10.1373/clinchem.2012.184077.

- [38] A.A. Khorana, C.W. Francis, K.E. Menzies, J.G. Wang, O. Hyrien, J. Hathcock, N. Mackman, M.B. Taubman, Plasma tissue factor may be predictive of venous thromboembolism in pancreatic cancer, *J. Thromb. Haemost.* (2008). doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03156.x.
- [39] A. Obry, T. Lequerre, J. Hardouin, O. Boyer, P. Fardellone<sup>8</sup>, P. Philippe<sup>9</sup>, X. Le Loe, P. Cosette, O. Vittecoq, Identification of S100A9 as Biomarker of Responsiveness to the Methotrexate/ Etanercept Combination in Rheumatoid Arthritis Using a Proteomic Approach, *PLoS One.* 9 (2014) e115800.
- [40] M. Levi, T. Van Der Poll, Two-way interactions between inflammation and coagulation, *Trends Cardiovasc. Med.* 15 (2005) 254–259. doi:10.1016/j.tcm.2005.07.004.
- [41] M.M. Markiewski, B. Nilsson, K. Nilsson Ekdahl, T.E. Mollnes, J.D. Lambris, Complement and coagulation: strangers or partners in crime?, *Trends Immunol.* 28 (2007) 184–192. doi:10.1016/j.it.2007.02.006.
- [42] J.D. Pearson, Endothelial cell function and thrombosis, *Bailliere's Best Pract. Res. Clin. Haematol.* (1999). doi:10.1053/beh.1999.0028.
- [43] P. Nawroth, W. Kisiel, D. Stern, The role of endothelium in the homeostatic balance of haemostasis, *Clin Haematol.* 14 (1985) 531–546.
- [44] A.S. Wolberg, D.M. Monroe, H.R. Roberts, M.R. Hoffman, Tissue factor de-encryption: Ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms, *Blood Coagul. Fibrinolysis.* 10 (1999) 201–210. doi:10.1097/00001721-199906000-00007.
- [45] J. Hong, K. Nilsson Ekdahl, H. Reynolds, R. Larsson, B. Nilsson, A new in vitro model to study interaction between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin, *Biomaterials.* 20 (1999) 603–611. doi:10.1016/S0142-9612(98)00210-5.
- [46] F. Boccafoschi, C. Mosca, M. Ramella, I. Carmagnola, V. Chiono, G. Ciardelli, M. Cannas, Biological evaluation of materials for cardiovascular application: The role of the short-term inflammatory response in endothelial regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 101 (2013) 3131–3140. doi:10.1002/jbm.a.34630.
- [47] V. Ollivier, J. Wang, D. Manly, K.R. Machlus, A.S. Wolberg, M. Jandrot-Perrus, N. Mackman, Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay, *Thromb. Res.* 125 (2010) 90–6. doi:10.1016/j.thromres.2009.03.003.
- [48] E.M. Egorina, M.A. Sovershaev, G. Bjørkøy, F.X.E. Gruber, J.O. Olsen, B. Parhami-Seren, K.G. Mann, B. Østerud, Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: Application to intersubject variability, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2005). doi:10.1161/01.ATV.0000168413.29874.d7.
- [49] S. Butenas, J. Krudysz-Amblo, Decryption of tissue factor, *Thromb. Res.* 129 (2012). doi:10.1016/j.thromres.2012.02.022.
- [50] L.V.M. Rao, H. Kothari, U.R. Pendurthi, Tissue Factor: Mechanisms of Decryption, *Front. Biosci.* (2012). doi:10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

- [51] M. Erdemoğlu, M. Sarikaya, Effects of heavy metals and oxalate on the zeta potential of magnetite, *J. Colloid Interface Sci.* (2006). doi:10.1016/j.jcis.2006.04.004.
- [52] E. Kaivosoja, S. Myllymaa, Y. Takakubo, H. Korhonen, K. Myllymaa, Y.T. Konttinen, R. Lappalainen, M. Takagi, Osteogenesis of human mesenchymal stem cells on micro-patterned surfaces, *J. Biomater. Appl.* 27 (2013) 862–871. doi:10.1177/0885328211428094.
- [53] T.A. Simoes, A.P. Brown, S.J. Milne, R.M.D. Brydson, Bovine serum albumin binding to CoCrMo nanoparticles and the influence on dissolution, *J. Phys. Conf. Ser.* 644 (2015). doi:10.1088/1742-6596/644/1/012039.
- [54] W.G. Brodbeck, E. Colton, J.M. Anderson, Effects of adsorbed heat labile serum proteins and fibrinogen on adhesion and apoptosis of monocytes/macrophages on biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 671–675.
- [55] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.
- [56] Z. Xia, J.T. Triffitt, A review on macrophage responses to biomaterials, *Biomed. Mater.* (2006). doi:10.1088/1748-6041/1/1/R01.
- [57] J.M. Anderson, Multinucleated giant cells, *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000) 40–47. doi:10.1097/00062752-200001000-00008.
- [58] T.L. Bonfield, E. Colton, J.M. Anderson, Plasma protein adsorbed biomedical polymers: Activation of human monocytes and induction of interleukin 1, *J. Biomed. Mater. Res.* 23 (1989) 535–548. doi:10.1002/jbm.820230602.
- [59] J.E. McBane, L.A. Matheson, S. Sharifpoor, J.P. Santerre, R.S. Labow, Effect of polyurethane chemistry and protein coating on monocyte differentiation towards a wound healing phenotype macrophage, *Biomaterials.* 30 (2009) 5497–5504. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.010.
- [60] J. Vilcek, T. Lee, Tumor necrosis factor, *Biol Chem.* 266 (1991) 7313–7316.
- [61] M. Field, A. Cook, G. Gallagher, Immuno-localisation of tumour necrosis factor and its receptors in temporal arteritis, *Rheumatol. Int.* (1997). doi:10.1007/s002960050019.
- [62] E. Camerer, A.B. Kolstø, H. Prydz, Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation, *Thromb. Res.* 81 (1996) 1–41. doi:10.1016/0049-3848(95)00209-X.
- [63] M. Ernofsson, A. Siegbahn, Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemotactic protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor, *Thromb. Res.* 83 (1996) 307–320.
- [64] M. Yang, C. Deng, D. Wu, Z. Zhong, X. Lv, Z. Huang, N. Lian, K. Liu, Q. Zhang, The role of mononuclear cell tissue factor and inflammatory cytokines in patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension, *J. Thromb. Thrombolysis.* 42 (2016) 38–45. doi:10.1007/s11239-015-1323-2.
- [65] M.F. Shamji, P. Hwang, R.W. Bullock, S.B. Adams, D.L. Nettles, L.A. Setton, Release and activity of anti-TNF $\alpha$  therapeutics from injectable chitosan preparations for local drug delivery, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 90 B (2009) 319–326.

doi:10.1002/jbm.b.31289.

- [66] M.B. Gorbet, M. V. Sefton, Leukocyte activation and leukocyte procoagulant activities after blood contact with polystyrene and polyethylene glycol-immobilized polystyrene beads, *J. Lab. Clin. Med.* 137 (2001) 345–355. doi:10.1067/mlc.2001.114677.
- [67] W.J. Kao, D. Lee, J.C. Schense, J.A. Hubbell, Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: The role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains, *J. Biomed. Mater. Res.* 55 (2001) 79–88. doi:10.1002/1097-4636(200104)55:1<79::AID-JBM110>3.0.CO;2-Z.
- [68] T. Takizawa, S. Nishinarita, N. Kitamura, J. Hayakawa, H. Kang, Y. Tomita, K. Mitamura, K. Yamagami, T. Horie, Interaction of the cell-binding domain of fibronectin with VLA-5 integrin induces monokine production in cultured human monocytes, *Clin. Exp. Immunol.* 101 (1995) 376–382. doi:10.1111/j.1365-2249.1995.tb08367.x.
- [69] D.F. Mosher, Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor., *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 6614–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1158872>.
- [70] J. Cho, D.F. Mosher, Enhancement of thrombogenesis by plasma fibronectin cross-linked to fibrin and assembled in platelet thrombi, *Blood.* 107 (2006) 3555–3563. doi:10.1182/blood-2005-10-4168.
- [71] H.M. Rostam, S. Singh, F. Salazar, P. Magennis, A. Hook, T. Singh, N.E. Vrana, M.R. Alexander, A.M. Ghaemmaghami, The impact of surface chemistry modification on macrophage polarisation, *Immunobiology.* (2016). doi:10.1016/j.imbio.2016.06.010.
- [72] C. Rubel, G.C. Fernandez, G. Dran, M.B. Bompadre, M.A. Isturiz, M.S. Palermo, Fibrinogen Promotes Neutrophil Activation and Delays Apoptosis, *J. Immunol.* 166 (2001) 2002–2010. doi:10.4049/jimmunol.166.3.2002.
- [73] J.M. Grunkemeier, W.B. Tsai, C.D. McFarland, T.A. Horbett, The effect of adsorbed fibrinogen, fibronectin, von Willebrand factor and vitronectin on the procoagulant state of adherent platelets, *Biomaterials.* 21 (2000) 2243–2252. doi:10.1016/S0142-9612(00)00150-2.
- [74] J. Kreuzer, S. Denger, A. Schmidts, L. Jahn, M. Merten, E. Von Hodenberg, Fibrinogen promotes monocyte adhesion via a protein kinase C dependent mechanism, *J. Mol. Med.* 74 (1996) 161–165. doi:10.1007/BF01575449.
- [75] A.K. McNally, J.M. Anderson, Complement C3 participation in monocyte adhesion to different surfaces, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 10119–10123. doi:10.1073/pnas.91.21.10119.
- [76] M. Berger, B. Broxup, M. V. Sefton, Using Elisa to evaluate complement activation by reference biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 622–627. doi:10.1007/BF00120343.
- [77] B.A. Bouchard, P.B. Tracy, Platelets, leukocytes, and coagulation, *Curr. Opin. Hematol.* (2001). doi:10.1097/00062752-200109000-00001.

## **Supplementary materials:**

### **Viability assay**

The viability of monocytes and macrophages was evaluated using an LDH assay, applying the Pierce LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Scientific) and following the manufacturer's instructions. The 96-well plate was centrifuged at 1500 g for 5 min at room temperature and the supernatants were collected. The total quantity of LDH for 300 000 monocytes/mL was obtained using Triton 0.1% for cell lysis over 45 min à 37°C. To determine LDH activity, the absorbance at 680 nm (background signal) was subtracted from the absorbance at 490 nm.

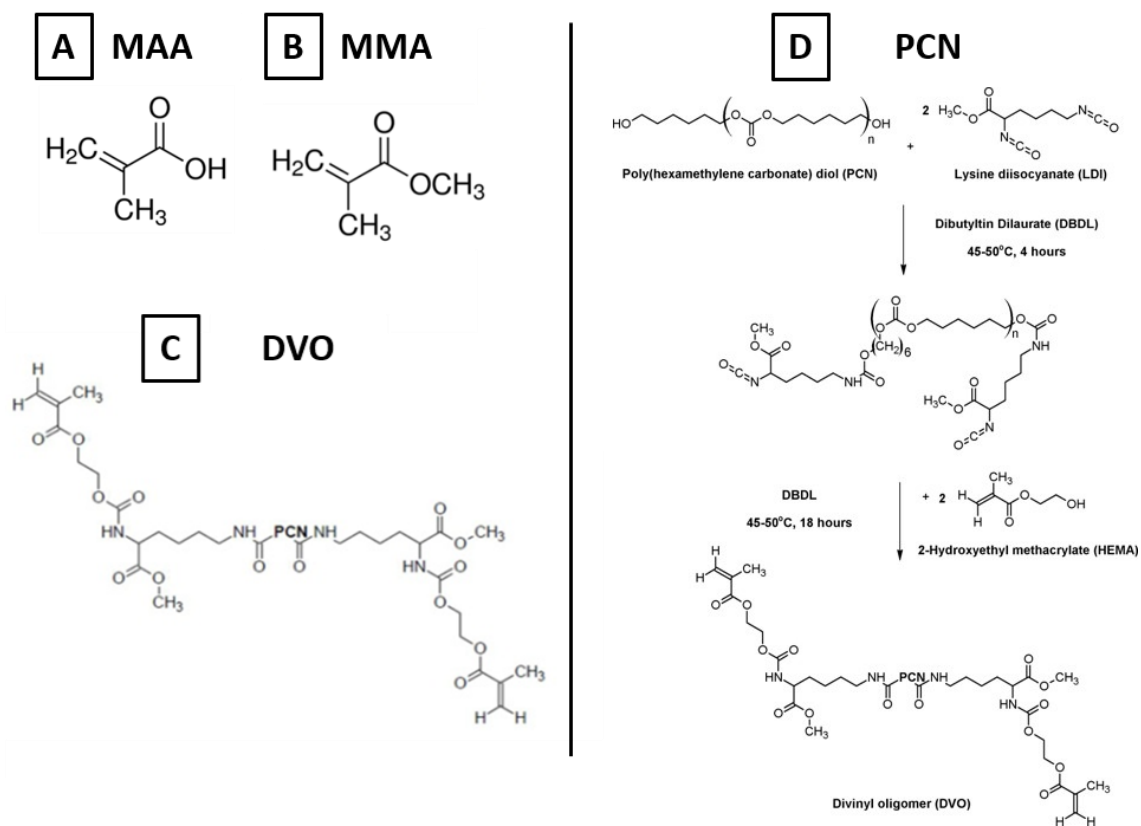
### **Hemolysis**

Whole blood (anticoagulated with lithium heparinate) was incubated on the different surfaces for 24h at 37°C. The presence of hemoglobin was measured in the poor platelet plasma obtained after centrifugation (1200 g, 15 min) using formic acid. The absorbance was read at 405 nm.

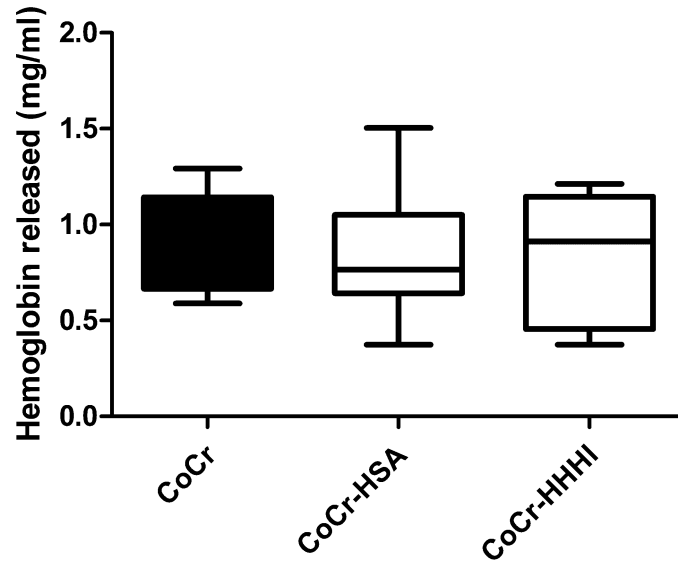
### **Detection of NF- $\kappa$ B activation in monocytes by immunofluorescence**

Surfaces were rinsed with PBS, fixed with a 4% para-formaldehyde solution for 20 min at room temperature and then rinsed with PBS. The permeabilization of the cells was performed with PBS-Triton 0.1%-Tween 20 (0.05%) for 15 min at room temperature. Non-specific binding sites were blocked by incubating the substrates in PBS-BSA (3%) for 1 h at room temperature. Nuclei and NF- $\kappa$ B were labelled using NucBlue (Invitrogen) and a specific antibody (BD Biosciences, Clone 20/NF- $\kappa$ B/p65), respectively. Visualization was performed with a LSM710 confocal microscope (Carl Zeiss).

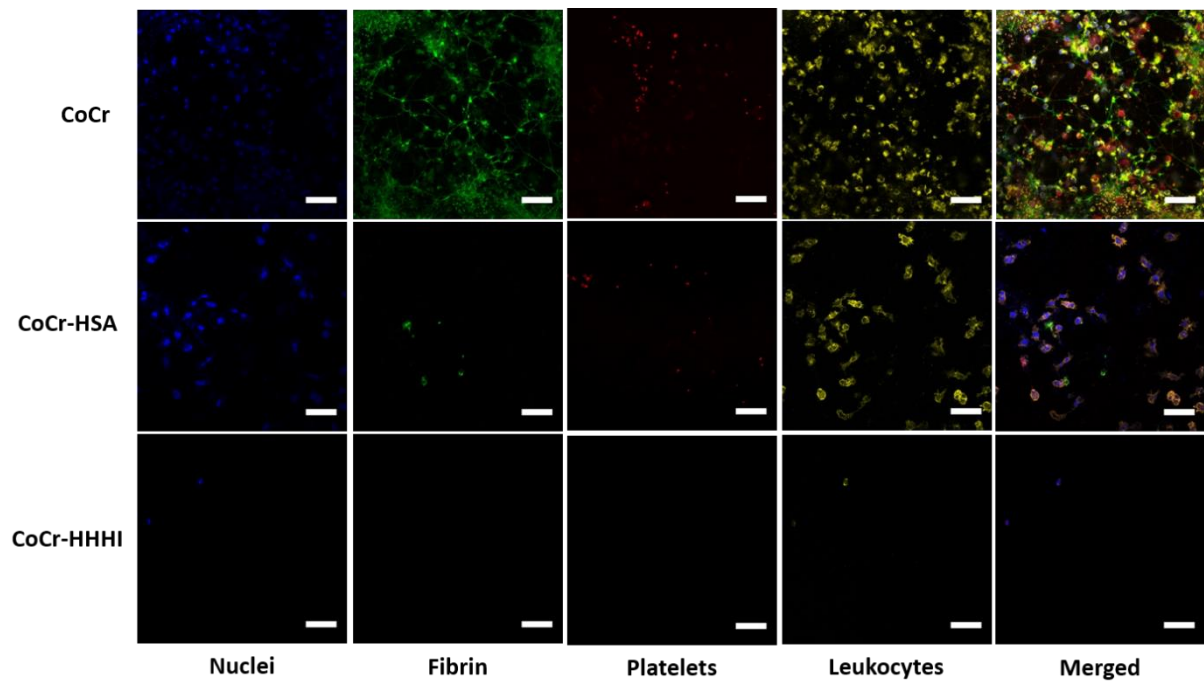
Supplementary Figures:



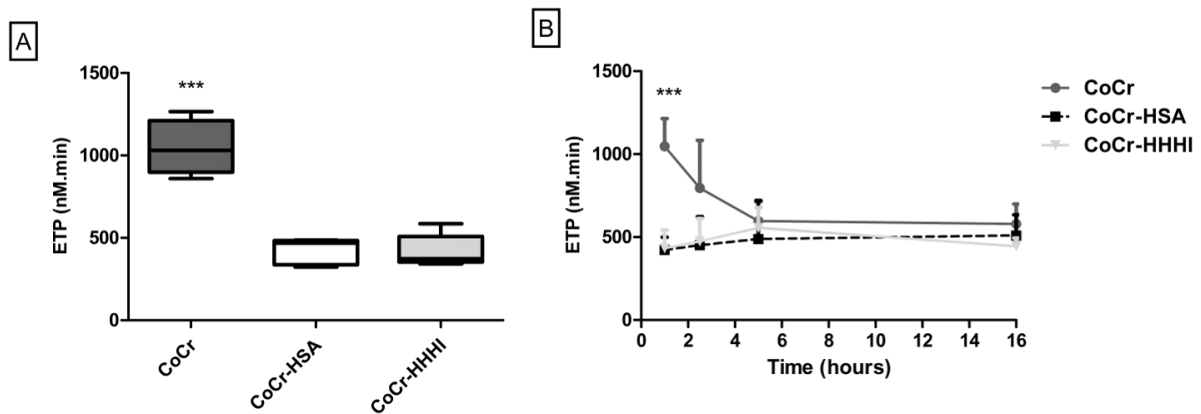
**Supplementary Figure S1:** Schematic representation of the HHHI's monomers. A) methacrylic acid (MAA) with its pendent carboxylic acid group which provides the polymer with the anionic content. B) methyl methacrylate (MMA) with its pendent methyl group which provides hydrophobic character. C) divinyl oligomer (DVO) with its carbonates and urethanes which provide non-ionic polar character. D) Poly(hexamethylene carbonate) diol (PCN) contained in the DVO monomer (Sharifpoor *et al.* Biomacromolecules 2009; 10: 2729.). All materials react with each other via their vinyl groups in a free radical polymerization.



**Supplementary Figure S2:** Quantification of hemolysis after 24h of whole blood incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. n=3, triplicates with 3 different blood donors. Medians and quartiles are presented.

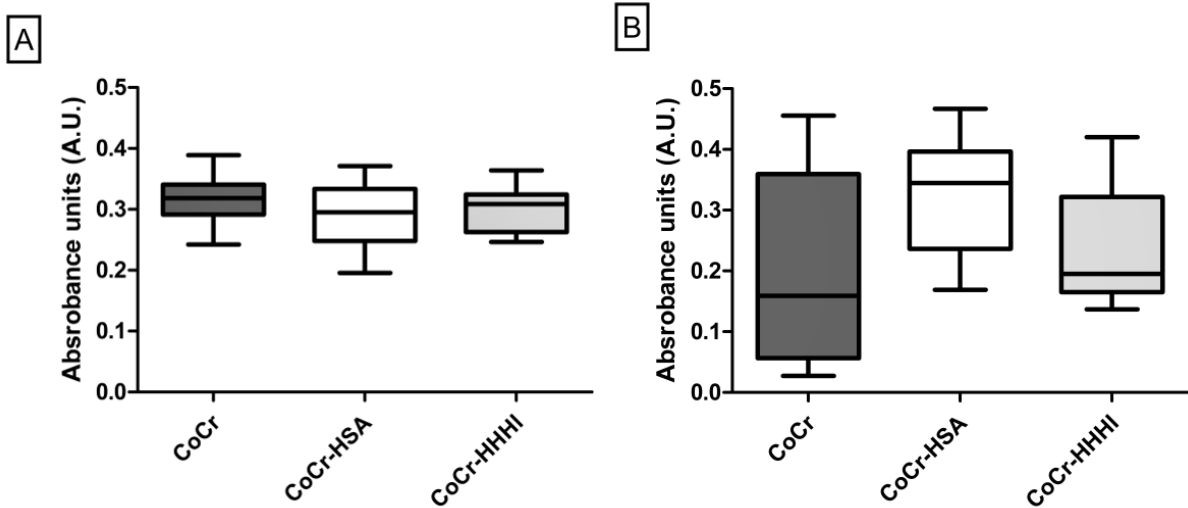


**Supplementary Figure S3:** Immunostaining after 24h of incubation of whole blood at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. Confocal microscopy representative images out of 2 different experiments performed in triplicate with 2 different blood donors are shown. Cell nuclei (blue), fibrin (green), platelets (red) and leukocytes (yellow). Scale bar = 50  $\mu$ m.



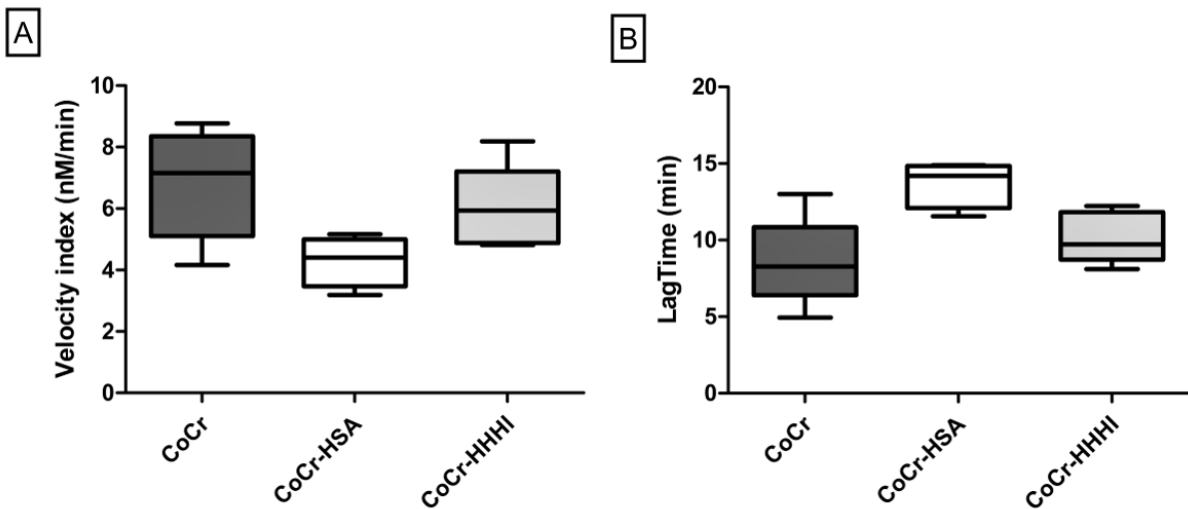
**Supplementary Figure S4:** Thrombin generation in whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. A) ETP after 1h of incubation and B) Kinetic at 1h, 2h30, 5h and 16h of incubation at 37°C. n=2-4, triplicates with 2-4 different blood donors, Medians and quartiles (A) and Means  $\pm$  SD (B) are presented. \*\*\*p<0.001.





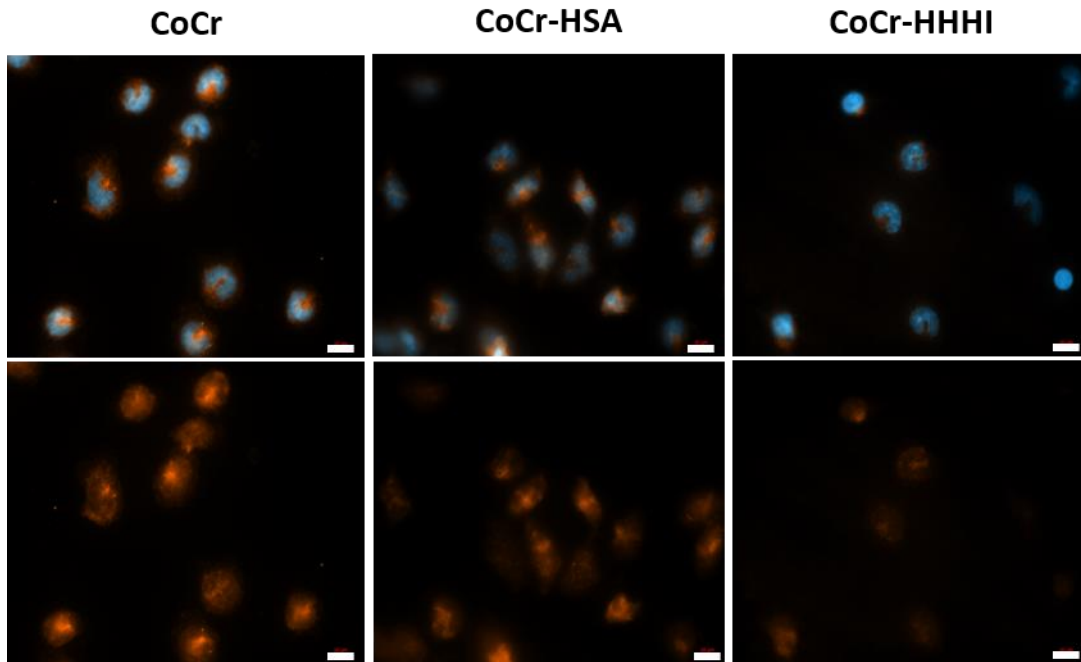
**Supplementary Figure S5:** Quantification of monocytes (A) and macrophages (B) viability by LDH assay after 24h (monocytes) or 8 days (macrophages) of incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. n=6, triplicates with 6 different blood donors.

Medians and quartiles are presented.



**Supplementary Figure S6:** Thrombin generation in poor platelet plasma (PPP) incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. A) Velocity index and B) Lagtime after 24h of incubation at 37°C. n=6, triplicates with 6 different blood donors. Medians and quartiles are

presented.



**Supplementary Figure S7:** Immunostaining after 1h of incubation of isolated monocytes at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA or HHHI. Confocal microscopy representative images out of 2 different experiment performed in triplicate with 2 different blood donors are shown. Cell nuclei (blue) and NF-κB (orange). Scale bar = 10 μm.

Surfaces	Contact angle (°)	Thickness
HHHI bulk	80° ± 4	1.3 mm ± 0.2
CoCr-HHHI thin film	77° ± 2	5.2 μm ± 1.8
CoCr	56° ± 6	N.A.

**Supplementary Table S1:** Water contact angle and coating thickness measurements of different surfaces. Means ± S.D. n=3, repeated 3 times. N.A. = Not Applicable

### **Conclusions**

La nécessité de mettre au point des biomatériaux efficaces dans le domaine des dispositifs cardiovasculaires incite la communauté scientifique à améliorer la biocompatibilité des biomatériaux implantés. La stratégie de cette étude a été de recouvrir le CoCr, utilisé dans la fabrication des endoprothèses vasculaires, par des films minces de polyuréthane, HHHI, afin de limiter les effets pro-inflammatoires et pro-thrombotiques décrits pour ce métal. La réactivité du sang total, des monocytes et des macrophages a été plus particulièrement étudiée et cette étude a permis de montrer que la présence de films minces de polyuréthanes à la surface de CoCr permettait de limiter la génération de thrombine et d'éviter la formation d'un réseau de fibrine lors de leur interaction avec le sang total. Cette activation de la coagulation observée en sang total pourrait être, en partie, initiée par l'expression monocyttaire de facteur tissulaire, initiateur majeur de la coagulation. En effet, les monocytes, au contact du CoCr, s'activent et sont capable de synthétiser et d'exprimer à leur surface le facteur tissulaire. Cette voie d'activation de la coagulation est limitée en présence des revêtements de polyuréthane qui réduisent les phénotypes pro-thrombotique et pro-inflammatoire des monocytes et des macrophages induits par le CoCr. Ce travail souligne l'importance d'évaluer la biocompatibilité d'un biomatériau dans sa globalité et l'expression du facteur tissulaire par les monocytes, en particulier pour tous les biomatériaux en contact avec le sang.

## **Chapitre 4 : Discussion Générale, Conclusions & Perspectives**

---

Les situations pathologiques affectant le système cardiovasculaire nécessitent la mise au point de biomatériaux spécifiques. Ces derniers doivent posséder des propriétés optimisées en termes de biocompatibilité avec le tissu sanguin.

Les endoprothèses vasculaires sont généralement constitués d'une structure métallique et ont évolué, en partie, pour permettre l'élution de molécules thérapeutiques. Ces dispositifs nécessitent l'utilisation de polymères qui vont jouer le rôle de réservoir de médicaments [130]. Cependant, un des problèmes récurrents de ces polymères reste leur **hémocompatibilité médiocre** provoquant un dysfonctionnement endothélial, une inflammation chronique au site de l'implantation ou encore une thrombose [91]. Récemment, des travaux menés sur 253 thromboses de stent ont montré que dans 65,6% des cas les stents implantés étaient des stents à élution de médicaments recouverts de polymères alors que seulement 31,2% étaient des stents en métal nu, soit 2 fois moins [107]. Ces polymères peuvent également être utilisés dans la conception de substituts vasculaires synthétiques. Cependant, des études ont montré que des polymères tels que le polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE) et le polyéthylène téréphtalate (PET), utilisés pour des greffes vasculaires de grand diamètre, provoquent une thrombose ou une hyperplasie néo-intimale lorsqu'ils sont utilisés pour des greffes vasculaires de diamètre inférieur à 6 mm [120,125].

C'est dans ce contexte que s'est inscrit l'objectif global de cette thèse qui a consisté en l'étude de la biocompatibilité de **polyuréthanes** spécifiques destinés à être utilisés pour des applications cardiovasculaires. Les polyuréthanes sont de plus en plus utilisés car ils présentent de nombreux avantages pour des applications en ingénierie biomédicale. Ils peuvent être obtenus à partir molécules de nature chimique variée, ont des propriétés physico-chimiques modulables et sont relativement biocompatibles.

Au cours ce travail de doctorat, un polyuréthane spécifique appelé **D-PHI** (Degradable-Polar/Hydrophobic/Ionic) a été utilisé. Des études menées sur plusieurs types cellulaires tels que les cellules musculaires vasculaires lisses [9], les cellules endothéliales [11] et les fibroblastes [12], ont montré que le D-PHI était biocompatible et non cytotoxique. De plus, ce polyuréthane semble diminuer l'activation des monocytes. Cependant, cette activation a principalement été étudiée sur l'aspect inflammatoire *via* la sécrétion de cytokines mais n'a jamais été caractérisée sur l'aspect coagulation en suivant l'expression du facteur tissulaire et la génération de thrombine, facteur déterminant lorsqu'on s'intéresse, par exemple, à la thrombose de stent après implantation.

Ce polyuréthane est composé de 3 monomères avec des ratios molaires bien spécifiques. Chaque monomère apporte des caractères différents : polaire non ionique (Divinyl Oligomère), hydrophobe (Acide méthacrylique) ou anionique (Méthacrylate de méthyle). Ceci génère une grande diversité chimique semblable à celle retrouvée dans les résidus peptidiques des protéines. De plus, l'utilisation de ce polyuréthane offre la possibilité, en faisant varier les ratios molaires, de faire varier ses caractères et ainsi étudier l'influence de la chimie intrinsèque des matériaux. Les groupements fonctionnels de surface des matériaux sont connus pour influencer l'adsorption et la conformation de protéines ainsi que l'adhésion des cellules [247]. Deux formulations principales ont donc été utilisées : la formule originale appelée O-D-PHI et une deuxième formulation appelée HHHI (High Hydrophobic, High Ionic) où les caractères anionique et hydrophobe ont été augmentés par rapport au caractère polaire.

Les résultats ont montré une **influence de la chimie intrinsèque** des matériaux sur l'adsorption et la disponibilité de séquences spécifiques de protéines telles que la Fibronectine (Fn) ainsi que sur l'activation des monocytes. En effet, le O-D-PHI a montré une plus grande disponibilité de séquences spécifiques, impliquées dans l'activation des monocytes, comparé au HHHI. Ces résultats sont corrélés avec un étalement des monocytes et une présence de pseudopodes, marqueurs d'activation bien connus dans la littérature [248], plus important sur le O-D-PHI comparé au HHHI.

Des travaux précédents ont permis de démontrer l'influence de la chimie intrinsèque des matériaux en comparant le O-D-PHI à une autre formulation : le LHLI (Low Hydrophobic, Low Ionic), une formulation dérivée de la formule d'origine avec un caractère polaire augmenté comparé aux caractères ionique et hydrophobe. Ces travaux ont montré que les monocytes semblaient légèrement plus activés sur le O-D-PHI comparé au LHLI. Cependant, lorsque les surfaces étaient recouvertes avec de l'immunoglobuline G (IgG), les monocytes conservaient le même état d'activation sur le O-D-PHI mais étaient beaucoup plus activés sur le LHLI. Les caractères ionique et hydrophobe semblent avoir un rôle important dans la manière dont l'IgG s'adsorbe et ses conséquences sur le comportement cellulaire notamment sur l'activation des monocytes [249].

Dans un contexte d'application cardiovasculaire avec implantation de stent, le sang est toujours directement en contact avec le biomatériau. La biocompatibilité de ce support est donc d'une importance particulière. Elle concerne principalement la réponse thrombotique et inflammatoire induite par le biomatériau qui implique l'activation du système immunitaire innée humorale [5]. Le cobalt chrome (CoCr) est un alliage métallique souvent utilisé dans la

fabrication des stents. Il présente des propriétés intéressantes : il est non magnétique, résistant à l'usure et à la corrosion [13,14]. Cependant, des études ont montré qu'il était pro-thrombotique et pro-inflammatoire [15,16]. En effet, il active les plaquettes et les facteurs de la coagulation et induit l'adhésion et l'activation des leucocytes d'où la nécessité d'améliorer la biocompatibilité de ce support. L'idée de ce projet a donc été d'associer au CoCr, le polyuréthane D-PHI (O-D-PHI et HHHI) qui a montré des propriétés intéressantes au cours de notre étude concernant notamment l'activation des monocytes. En associant le polyuréthane au CoCr, l'objectif était de **masquer les effets pro-thrombotique et pro-inflammatoire** du support métallique tout en conservant ses propriétés intéressantes telles que ses propriétés mécaniques ou sa résistance à la corrosion. Cependant, pour l'application médicale choisie, il était impératif de générer des films minces de quelques micromètres d'épaisseurs pour ne modifier que très peu l'épaisseur des mailles. En effet, des études ont montré que ce paramètre jouait un rôle important dans les phénomènes de resténose et de thrombose [98,99]. Or, ces polyuréthanes sont des solutions visqueuses qui génèrent des matériaux épais. L'utilisation d'un solvant, le tétrahydrofurane (THF), a donc été nécessaire et nous a permis de générer des films minces de quelques micromètres d'épaisseur (5  $\mu\text{m}$ ). Le solvant a légèrement modifié les propriétés de surface des matériaux tels que la composition atomique de surface, l'angle de contact ou encore la cristallisation en surface du matériau influençant la topographie de surface. En revanche, ces légères modifications de surface ont eu une influence non négligeable sur l'adsorption et l'accessibilité de séquences spécifiques de l'IgG et de la Fn. En ce qui concerne l'exposition du segment Fab de l'IgG, aucune différence significative n'a été observée entre les 2 formulations O-D-PHI et HHHI ce qui indique que la chimie intrinsèque des matériaux n'influence pas l'exposition du segment Fab de l'IgG. Cependant, une différence significative a été observée au sein d'une même formulation en fonction de l'épaisseur (*i.e.* O-D-PHI épais vs O-D-PHI films minces et HHHI épais vs HHHI films minces). Les films minces de O-D-PHI et HHHI entraînent une diminution de l'exposition de ce segment comparé aux matériaux épais. Ces résultats suggèrent que l'utilisation de solvant et donc la modification des propriétés de surface des matériaux, notamment la topographie, joue un rôle dans l'exposition du segment Fab de l'IgG. En ce qui concerne la disponibilité du Cell Binding Domain (CBD) de la Fn, la formulation des polyuréthanes a une influence sur l'adsorption de la protéine, avec une disponibilité plus faible sur la formulation HHHI comparée au O-D-PHI, quel que soit l'épaisseur du matériau. L'exposition du domaine N terminal est, quant à elle, influencée par l'épaisseur des PUs et non par la formulation. Notre première étude (**Article 1**), qui portait sur l'étude de l'influence de la chimie intrinsèque des matériaux épais, a montré une influence sur

l'exposition du domaine N terminal entre les 2 formulations de PUs. Cependant lors de cette étude, l'anticorps utilisé était dirigé spécifiquement contre la séquence fibrine-domaine du domaine N terminal (FI 1-5) (**voir Figure 1, Article 1**) alors que dans l'**article 2**, l'anticorps utilisé était dirigé contre l'ensemble de la séquence N terminale 70 kDa (FI 1-9/F2 1-2). Ceci semble suggérer qu'il y a une influence de la chimie intrinsèque sur le domaine N terminal détecté avec un anticorps spécifique dirigé contre la séquence fibrine-domaine mais qui n'est plus détecté lorsque l'anticorps est dirigé contre une séquence plus grande.

Il est bien connu dans la littérature que les caractéristiques de surface d'un matériau telles que la topographie, l'hydrophobie, la rugosité, la charge ont une influence sur l'adsorption et la façon dont les protéines vont s'adsorber. La topographie à l'échelle micrométrique influence les interactions protéines-surface [139] et la composition chimique de surface favorise des types de liaison différents entre surface et protéines [135]. Une étude a montré que la chimie intrinsèque des matériaux influence l'exposition du segment Fab de l'IgG. En effet, 5 formulations, notamment O-D-PHI, le HHHI et le LHLI (Low Hydrophobic, Low Ionic) ont été étudiées. Aucune différence significative n'a été observée entre le O-D-PHI et le HHHI en revanche, le matériau LHLI (contenant le caractère polaire le plus élevé et les caractères ionique et hydrophobe les plus faibles) expose plus de segment Fab de l'IgG comparé aux 4 autres formulations [249]. Ces résultats indiquent que les caractères ioniques et hydrophobes n'ont pas influencé l'adsorption de l'IgG mais que l'augmentation du caractère polaire semble influencer l'exposition du segment Fab de l'IgG.

Les modifications de surface dues à l'utilisation de THF n'ont en revanche pas eu de réel impact sur l'activité des monocytes. En effet, que les polyuréthanes soient sous forme de matériaux épais ou de films minces, les monocytes présentent une morphologie et une sécrétion de cytokines caractéristiques d'un faible état d'activation. Cependant, la diminution de l'épaisseur peut avoir une influence non négligeable sur la **stabilité** à long terme du matériau. Cette stabilité a été étudiée sur le matériau O-D-PHI épais uniquement et a montré une perte de masse de 21% après une période d'implantation de 100 jours chez le rat [243]. Cette étude sur la stabilité, non seulement dans le temps mais aussi la résistance à la déformation, sera essentielle pour la poursuite de ce projet notamment pour des applications de stents cardiovasculaires.

L'étude de la biocompatibilité de ces films minces de polyuréthanes (O-D-PHI et HHHI) a montré que même avec une épaisseur de seulement 5  $\mu\text{m}$ , ces matériaux permettaient de masquer les effets pro-thrombotique et pro-inflammatoire du CoCr. Bien que l'article 3 ne



montre que les résultats avec le HHHI, la surface de O-D-PHI a également été étudiée mais les résultats n'ont pas été publiés. Aucune différence significative n'a été constatée entre les 2 films minces de polyuréthanes (O-D-PHI vs HHHI) (**Annexe 3**). Cependant, nos études réalisées sur le sang total ont montré une activation légèrement supérieure de la coagulation (*i.e.* génération de thrombine, dosage de complexe thrombine anti-thrombine) sur le O-D-PHI comparé au HHHI. L'adsorption des protéines du « plasma free platelets » (PFP) sur les différentes surfaces a montré que le O-D-PHI adsorbe plus de protéines (fibrinogène, Fn et complément C3, C4 et C8) comparé au HHHI. En revanche, aucune différence significative n'a été observée quant à la réactivité des monocytes excepté l'étalement des cellules, marqueur d'activation.

Malgré ces légères différences entre les films minces de O-D-PHI et de HHHI, l'étude a montré que le recouvrement par ces deux polyuréthanes diminuait fortement et significativement l'activation de la coagulation, des monocytes et des macrophages comparés au CoCr nu, peu importe la formulation. **L'activité du facteur tissulaire (FT)**, initiateur majeur de la voie extrinsèque de la coagulation, a été évaluée à la surface des monocytes à des temps courts (1h) et longs (24h) et était beaucoup plus importante sur le CoCr comparé aux films minces de O-D-PHI et HHHI, quel que soit le temps d'incubation. L'activité du facteur tissulaire (FT) à la surface des monocytes dès 1h peut être expliquée par le fait qu'il existe une petite quantité de FT intracellulaire déjà présent dans le monocyte [74] ou inactif dans la membrane [75]. Après activation du monocyte, le FT va être activé et exposé à la surface de la cellule. En parallèle, l'activation du monocyte *via* des récepteurs spécifiques va également induire la synthèse de FT. Cette synthèse fait intervenir le **facteur de transcription NF-κB**. Lorsqu'il est dissocié de son inhibiteur, après phosphorylation de ce dernier, est transloqué du cytoplasme vers le noyau, et permet la transcription du gène qui code pour le FT. L'ARNm est synthétisé 1h à 2h après activation et la synthèse de la protéine peut se voir dès 4h [250]. Ce mécanisme explique donc l'activité tardive du FT observée à 24h. Des marquages de NF-κB par immunofluorescence ont montré qu'il était beaucoup plus présent sur le CoCr comparé aux deux polyuréthanes ce qui implique une transcription du gène plus importante. Ces résultats impliquent donc une synthèse *de novo* de FT impliquant NF-κB tandis que l'activité de FT à la surface des monocytes dosé après seulement 1h de contact avec le CoCr implique une activation du FT déjà présent dans la membrane du monocyte. Ce mécanisme d'activation et l'expression du gène du FT pourraient néanmoins être approfondis. L'étude de l'expression d'ARNm par Q-PCR peut être envisagée afin de confirmer ces hypothèses. Il existe divers récepteurs (TNF-R, TLR, IL1-R ...) permettant de dissocier NF-κB de son inhibiteur par phosphorylation

[251,252]. En bloquant certains récepteurs, il serait possible d'identifier par quel(s) récepteur(s) la synthèse de FT est initiée.

Les **macrophages** arrivent rapidement sur le site d'implantation et jouent un rôle important dans l'intégration d'un biomatériau par le corps et la résolution de l'inflammation [253]. Les résultats de notre étude ont montré que, par rapport au CoCr nu, l'étalement des macrophages était beaucoup plus faible sur les films minces de polyuréthanes et que ceux-ci sécrétaient moins de cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ ) mais autant de cytokines anti-inflammatoires (IL-10). Ces données suggèrent que les macrophages semblent moins activés sur les polyuréthanes comparés au CoCr. Cependant, notre étude s'est limitée à quelques analyses, il serait intéressant d'aller plus loin dans la compréhension de l'activation des macrophages. Des travaux précédents ont étudié 2 types de supports : l'acier inoxydable 316 L et un alliage de magnésium biodégradable appelé JDBM-2. Ils ont montré que la surface biodégradable favorisait la **fusion des macrophages** en « foreign body giant cell » [254]. Dans notre étude, nous semblons observer ce phénomène sur le CoCr après 8 jours d'incubation. En effet, les macrophages sont joints les uns aux autres comme s'ils allaient fusionner entre eux pour former une cellule géante à corps étranger (« Foreign Body Giant Cell »).

Il est bien connu que les **macrophages** sont capables de synthétiser et d'exprimer du **FT** [255], tout comme les monocytes, ceci pourrait être une piste intéressante pour examiner l'effet des films minces de polyuréthanes sur l'activation des macrophages à des temps plus longs comme 8 ou 14 jours.

Un autre paramètre important concernant l'état d'activation des **macrophages** est leur polarisation. Selon l'activation des macrophages par le microenvironnement en lien avec le biomatériau, ceux-ci peuvent se **polariser** vers un état **pro-inflammatoire** (M1) ou **anti-inflammatoire** (M2) [180]. Cette polarisation sera déterminante pour le devenir du biomatériau. Une étude a montré que le processus de différenciation des monocytes en macrophages et leur polarisation dépendent des micro- et nano-structures présentes à la surface du polymère et de l'état d'activation des monocytes [256]. L'étude de la polarisation des macrophages sur nos différents support pourrait donc nous donner plus d'informations sur leur état d'activation et sur l'intégration du biomatériau. Cette étude pourrait être réalisée par des immunomarquages avec des marqueurs spécifiques de polarisation tels que CCR7, CD80 ou iNOS pour les macrophages de type M1 et CD36, CD209 ou arginase-1 pour les macrophages de types M2 [257,258].

Le **système du complément** n'a pas été abordé dans cette étude mais joue un rôle important dans l'activation de la coagulation et l'inflammation et active notamment les monocytes et les neutrophiles [5,6]. Après incubation avec du PFP, les protéines adsorbées sur les différentes surfaces ont été quantifiées. Les résultats de spectrométrie de masse montrent que les quantités de complément C3, C4 et C8 adsorbées sur le CoCr sont plus importantes que sur les films minces de polyuréthanes. Ces résultats mériteraient d'être approfondis. Le dosage du **complexe C5b-9** est souvent utilisé pour doser l'activation du complément [246] et pourrait donc donner des informations supplémentaires concernant les propriétés non-activantes des films minces de polyuréthanes comparé au CoCr.

D'autres types cellulaires sont également importants dans les mécanismes de thrombose lié à l'implantation d'un biomatériau, et plus particulièrement des stents, tels que les **plaquettes**, les **polynucléaires neutrophiles** et les **cellules endothéliales** [6]. Les cellules endothéliales sont d'une importance particulière lorsqu'on s'intéresse aux stents. En effet, un retard de ré-endothélialisation du stent ou un dysfonctionnement endothélial a souvent été constaté [104]. Une étude précédente a montré que le CoCr modifiait le phénotype anti-coagulant des cellules endothéliales saines en phénotype pro-coagulant [15]. Il serait donc intéressant d'étudier la capacité de ces polyuréthanes à permettre une endothélialisation du stent où le phénotype anti-coagulant des cellules endothéliales serait conservé.

La réactivité des plaquettes et des neutrophiles a rapidement été examinée lors de ce travail de thèse. Les résultats préliminaires semblent être intéressants. Des images de morphologie obtenues par microscopie à balayage (MEB) montrent une augmentation de **l'adhésion des plaquettes** au cours du temps sur le CoCr et les films minces de O-D-PHI et HHHI. Cependant, dès 30 min les plaquettes sont activées au contact du CoCr avec une présence importante de pseudopodes alors que les films minces de polyuréthane O-D-PHI et HHHI empêchent cette activation plaquettaire et ceci durant 8h (**Annexe 2, Figure 1**). Pour évaluer **l'activation des plaquettes**, un dosage du facteur 4 plaquettaire (PF4, Platelet Factor 4) a été réalisé. Le PF4 est contenu dans les granules alphas et est libéré par les plaquettes après activation. Il induit la sécrétion de cytokines par les monocytes et facilite leur différenciation. Il inhibe également l'inactivation de la thrombine *via* l'héparine et l'anti-thrombine [259]. Les résultats montrent un relargage de PF4 par les plaquettes significativement plus important sur CoCr comparé au O-D-PHI et HHHI (**Annexe 2, Figure 2**) indiquant que le recouvrement du CoCr par un film mince de polyuréthanes est suffisant pour prévenir l'activation plaquettaire.

Concernant les neutrophiles, les images de MEB réalisées sur les différentes surfaces incubées avec des neutrophiles pendant 2h montrent qu'ils semblent beaucoup plus activés à la surface du CoCr avec des cellules beaucoup plus étalées et une présence de pseudopodes plus importante comparée aux films minces de polyuréthanes (**Annexe 3, Figure 1**). Cette **activation des neutrophiles** a également été évaluée par un dosage de **l'activité élastase**. L'élastase est contenue dans les granules primaires (azurophiles) des neutrophiles et libérée après activation, elle est capable de dégrader le TFPI, inhibiteur du FT [6]. L'activité élastase des neutrophiles est diminuée de 50% sur les films minces de O-D-PHI et HHHI comparé au CoCr (**Annexe 3, Figure 2**) confirmant la prévention de l'activation des neutrophiles par le recouvrement du CoCr avec le HHHI.

Enfin, toutes les études de cette thèse ont été réalisées dans des **conditions statiques**. Il serait maintenant intéressant de passer sur un modèle dynamique sous flux pour se rapprocher des conditions *in vivo* où le flux sanguin peut modifier l'activation des cellules [260,261]. Une étude *in vivo*, dans un modèle animal, avec implantation d'un stent recouvert d'un film mince de polyuréthane serait également nécessaire afin de comparer avec les résultats obtenus *in vitro* et vérifier que les propriétés anti-inflammatoire et anti-thrombotique sont conservées. Cependant, cela nécessitera **l'optimisation de la méthode de synthèse du polyuréthane**. En effet, le protocole de synthèse utilise un initiateur de polymérisation par la chaleur, et cette polymérisation est lente (24h). Ceci ne pose aucun problème lorsque l'on travaille sur des surfaces 2D comme les disques de CoCr car la solution de polymère ne s'écoule pas et reste sur le disque jusqu'à polymérisation complète. En revanche, un stent, est une structure 3D qui nécessitera donc une polymérisation très rapide afin de figer la solution sur l'ensemble de la surface du stent et éviter l'écoulement de la solution de polymère. Pour cela, un autre initiateur de polymérisation devra être utilisé afin de réaliser une polymérisation rapide.

**Les travaux de cette thèse ont donc permis de mettre en évidence l'importance de la chimie intrinsèque des polyuréthanes sur la manière dont les protéines du sang vont s'adsorber. Grâce à l'utilisation d'un solvant spécifique (le tétrahydrofurane), il a été possible de mettre au point des films minces de polyuréthanes sur des substituts métalliques (CoCr). Les résultats démontrent clairement que le recouvrement du CoCr par les 2 matériaux à base de polyuréthane permet de réduire fortement le phénotype pro-thrombotique et pro-inflammatoire des monocytes et des macrophages et empêche l'activation de la coagulation et la formation d'un réseau de fibrine en présence de sang total. Le CoCr est un métal de référence dans le domaine des dispositifs médicaux**

**cardiovasculaires qui est fortement sollicité pour la réalisation de prothèses endovasculaires. Son recouvrement par ces polyuréthanes, dont la synthèse est maîtrisée (stabilité, maturation, épaisseur ...), a permis d'améliorer son hémocompatibilité. Ces matériaux semblent donc très prometteurs et ouvrent des perspectives intéressantes pour des applications cliniques.**

# Références

---

- [1] J.M. Anderson, A. Rodriguez, D.T. Chang, Foreign body reaction to biomaterials, *Semin. Immunol.* 20 (2008) 86–100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004.
- [2] Y.X. Wang, J.L. Robertson, W.B. Spillman, R.O. Claus, Effects of the chemical structure and the surface properties of polymeric biomaterials on their biocompatibility, *Pharm. Res.* 21 (2004) 1362–1373. doi:10.1023/B:PHAM.0000036909.41843.18.
- [3] M. Rabe, D. Verdes, S. Seeger, Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces, *Adv. Colloid Interface Sci.* 162 (2011) 87–106. doi:10.1016/j.cis.2010.12.007.
- [4] M. Bornapour, H. Mahjoubi, H. Vali, D. Shum-Tim, M. Cerruti, M. Pekguleryuz, Surface characterization, in vitro and in vivo biocompatibility of Mg-0.3Sr-0.3Ca for temporary cardiovascular implant, *Mater. Sci. Eng. C.* (2016). doi:10.1016/j.msec.2016.04.108.
- [5] K.N. Ekdahl, S. Huang, B. Nilsson, Y. Teramura, Complement inhibition in biomaterial- and biosurface-induced thromboinflammation, *Semin. Immunol.* 28 (2016) 268–277. doi:10.1016/j.smim.2016.04.006.
- [6] M.B. Gorbet, M. V. Sefton, Biomaterial-associated thrombosis: Roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes, *Biomaterials.* 25 (2004) 5681–5703. doi:10.1016/B978-008045154-1.50025-3.
- [7] S.P. Grover, N. Mackman, Tissue Factor: An Essential Mediator of Hemostasis and Trigger of Thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38 (2018) 709–725. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309846.
- [8] T. Kurihara, G. Warr, J. Loy, R. Bravo, Defects in Macrophage Recruitment and Host Defense in Mice Lacking the CCR2 Chemokine Receptor, *J. Exp. Med.* (1997). doi:10.1084/jem.186.10.1757.
- [9] S. Sharifpoor, R.S. Labow, J.P. Santerre, Synthesis and characterization of degradable polar hydrophobic ionic polyurethane scaffolds for vascular tissue engineering applications, *Biomacromolecules.* 10 (2009) 2729–2739. doi:10.1021/bm9004194.

- [10] K.G. Battiston, R.S. Labow, J.P. Santerre, Protein binding mediation of biomaterial-dependent monocyte activation on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *Biomaterials*. 33 (2012) 8316–8328. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.08.014.
- [11] L.R. McDonald SM, Matheson LA, McBane JE, Kuraitis D, Suuronen E, Santerre JP, Use of monocyte/endothelial cell co-cultures (in vitro) and a subcutaneous implant mouse model (in vivo) to evaluate a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane, *J Cell Biochem*. 112(12):37 (2011). doi:10.1002/jcb.23307.
- [12] J.W.C. Cheung, D. Jain, C.A.G. McCulloch, J.P. Santerre, Pro-Angiogenic Character of Endothelial Cells and Gingival Fibroblasts Cocultures in Perfused Degradable Polyurethane Scaffolds, *Tissue Eng. Part A*. 21 (2015) 1587–1599. doi:10.1089/ten.tea.2014.0548.
- [13] J.R. Davis, *Metals Handbook*, 1998. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [14] A. Marti, Cobalt-base alloys used in bone surgery, *Injury*. 31 (2000) D18–D21. doi:10.1016/S0020-1383(00)80018-2.
- [15] V. Ollivier, C. Roques, N. Receveur, M. Gratz, L. Feldman, D. Letourneur, C. Gachet, P.H. Mangin, M. Jandrot-Perrus, Bioreactivity of stent material: Activation of platelets, coagulation, leukocytes and endothelial cell dysfunction in vitro, *Platelets*. 28 (2017) 529–539. doi:10.1080/09537104.2016.1252836.
- [16] E. Thiruppathi, M.K. Larson, G. Mani, Surface modification of CoCr alloy using varying concentrations of phosphoric and phosphonoacetic acids: Albumin and fibrinogen adsorption, platelet adhesion, activation, and aggregation studies, *Langmuir*. 31 (2015) 358–370. doi:10.1021/la5038712.
- [17] M. V. Sefton, C.H. Gemmell, M.B. Gorbet, What really is blood compatibility?, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11 (2000) 1165–1182. doi:10.1163/156856200744255.
- [18] A. De Mel, B.G. Cousins, A.M. Seifalian, Surface modification of biomaterials: A quest for blood compatibility, *Int. J. Biomater.* (2012). doi:10.1155/2012/707863.
- [19] D.F. Williams., *Blood compatibility*, 1987.
- [20] T. Junt, H. Schulze, Z. Chen, S. Massberg, T. Goerge, A. Krueger, D.D. Wagner, T. Graf, J.E. Italiano, R.A. Shivdasani, U.H. Von Andrian, Dynamic visualization of thrombopoiesis within bone marrow, *Science* (80-. ). 317 (2007) 1767–1770.

doi:10.1126/science.1146304.

- [21] S.R. Hanson, E.I. Tucker, Blood Coagulation and Blood - Materials Interactions, in: *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed.*, 2013. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00048-6.
- [22] T. Gremmel, A.L. Frelinger, A.D. Michelson, Platelet physiology, *Semin. Thromb. Hemost.* 42 (2016) 191–204. doi:10.1055/s-0035-1564835.
- [23] H.H. Versteeg, J.W.M. Heemskerk, M. Levi, P.H. Reitsma, New Fundamentals in Hemostasis, *Physiol. Rev.* 93 (2013) 327–358. doi:10.1152/physrev.00016.2011.
- [24] D. Blockmans, H. Deckmyn, J. Vermynen, Platelet activation, *Blood Rev.* 9 (1995) 143–156. doi:10.1016/0268-960X(95)90020-9.
- [25] B. Furie, B.C. Furie, Mechanisms of Thrombus Formation, *N. Engl. J. Med.* (2008). doi:10.1056/NEJMra0801082.
- [26] B. Engelmann, S. Massberg, Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 34–45. doi:10.1038/nri3345.
- [27] N. Mackman, R.E. Tilley, N.S. Key, Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2007). doi:10.1161/ATVBAHA.107.141911.
- [28] J.P. Riddel, B.E. Aouizerat, C. Miaskowski, D.P. Lillicrap, Theories of blood coagulation, *J. Pediatr. Oncol. Nurs.* 24 (2007) 123–131. doi:10.1177/1043454206298693.
- [29] H. Zelaya, A.S. Rothmeier, W. Ruf, Tissue factor at the crossroad of coagulation and cell signaling, *J. Thromb. Haemost.* 16 (2018) 1–12. doi:10.1111/jth.14246.
- [30] Y. Kamikubo, G.L. Mendolicchio, A. Zampolli, P. Marchese, A.S. Rothmeier, J.N. Orje, A.J. Gale, S. Krishnaswamy, A. Gruber, H. Østergaard, L.C. Petersen, W. Ruf, Z.M. Ruggeri, Selective factor VIII activation by the tissue factor–factor VIIa–factor Xa complex, *Blood.* 130 (2017) 1661–1670. doi:10.1182/blood-2017-02-767079.
- [31] T. Soeda, K. Nogami, T. Matsumoto, K. Ogiwara, M. Shima, Mechanisms of factor VIIa-catalyzed activation of factor VIII, *J Thromb Haemost.* 8 (2010) 2494–2503.
- [32] A.T. Long, E. Kenne, R. Jung, T.A. Fuchs, T. Renné, Contact system revisited: An



- interface between inflammation, coagulation, and innate immunity, *J. Thromb. Haemost.* 14 (2016) 427–437. doi:10.1111/jth.13235.
- [33] B. Furie, B. Furie, The molecular basis of blood coagulation, *Cell.* 53 (1988) 505–18.
- [34] S.R. Hanson, Device thrombosis and thromboembolism, *Cardiovasc. Pathol.* 2 (1993) 157–165.
- [35] M. a Blajchman, A.H. Özge-Anwar, The role of the complement system in hemostasis, *Prog. Hematol.* (1986). doi:10.1172/JCI90962.
- [36] D. Gailani, G.J. Broze, Factor XI activation in a revised model of blood coagulation, *Science* (80-. ). 253 (1991) 909–912. doi:10.1126/science.1652157.
- [37] C.T. Esmon, The interactions between inflammation and coagulation, *Br. J. Haematol.* 131 (2005) 417–430. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05753.x.
- [38] T. Palabrica, R. Lobb, B.C. Furie, M. Aronovitz, C. Benjamin, Y.M. Hsu, S.A. Sajer, B. Furie, Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets, *Nature.* 359 (1992) 848–851. doi:10.1038/359848a0.
- [39] J.W. Semple, J.E. Italiano, J. Freedman, Platelets and the immune continuum, *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011) 264–274. doi:10.1038/nri2956.
- [40] M. Berger, B. Broxup, M. V. Sefton, Using Elisa to evaluate complement activation by reference biomaterials, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (1994). doi:10.1007/BF00120343.
- [41] N. Borregaard, Neutrophils, from Marrow to Microbes, *Immunity.* 33 (2010) 657–670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011.
- [42] M. Cassatella, The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils, *Immunol Today.* 16 (1995) 21–26.
- [43] C.T.N. Pham, Neutrophil serine proteases: Specific regulators of inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 541–550. doi:10.1038/nri1841.
- [44] D.H. Allen, P.B. Tracy, Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 1408–1415. doi:10.1074/jbc.270.3.1408.
- [45] A.J. Gale, D. Rozenshteyn, Cathepsin G, a leukocyte protease, activates coagulation factor VIII, *Thromb. Haemost.* 99 (2008) 44–51. doi:10.1160/TH07-08-0495.

- [46] J. Plescia, D.C. Altieri, Activation of Mac-1 (CD11b/CD18)-bound factor X by released cathepsin G defines an alternative pathway of leucocyte initiation of coagulation., *Biochem. J.* 319 ( Pt 3 (1996) 873–9. doi:10.1042/bj3190873.
- [47] M. Jochum, S. Lander, N. Heimburger, H. Fritz, Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin iii, *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* 362 (1981) 103–112. doi:10.1515/bchm2.1981.362.1.103.
- [48] S. Massberg, L. Grahl, M.L. Von Bruehl, D. Manukyan, S. Pfeiler, C. Goosmann, V. Brinkmann, M. Lorenz, K. Bidzhekov, A.B. Khandagale, I. Konrad, E. Kennerknecht, K. Reges, S. Holdenrieder, S. Braun, C. Reinhardt, M. Spannagl, K.T. Preissner, B. Engelmann, Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases, *Nat. Med.* 16 (2010) 887–896. doi:10.1038/nm.2184.
- [49] H. Takei, A. Araki, H. Watanabe, A. Ichinose, F. Sendo, Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis, *J. Leukoc. Biol.* 59 (1996) 229–240. doi:10.1002/jlb.59.2.229.
- [50] B.G. Yipp, B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. De Boisfleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, P. Kubes, Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo, *Nat. Med.* 18 (2012) 1386–1393. doi:10.1038/nm.2847.
- [51] S.R. Clark, A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. DeVinney, C.J. Doig, F.H.Y. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood, *Nat. Med.* (2007). doi:10.1038/nm1565.
- [52] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria, *Science* (80-. ). 303 (2004) 1532–1535. doi:10.1126/science.1092385.
- [53] T.A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps, *J. Cell Biol.* 176 (2007) 231–241. doi:10.1083/jcb.200606027.

- [54] B. McDonald, R. Urrutia, B.G. Yipp, C.N. Jenne, P. Kubes, Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis, *Cell Host Microbe*. 12 (2012) 324–333. doi:10.1016/j.chom.2012.06.011.
- [55] T.A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D.D. Myers, S.K. Wroblewski, T.W. Wakefield, J.H. Hartwig, D.D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 15880–15885. doi:10.1073/pnas.1005743107.
- [56] F. Semeraro, C.T. Ammollo, J.H. Morrissey, G.L. Dale, P. Friese, N.L. Esmon, C.T. Esmon, Extracellular histones promote thrombin generation through platelet-dependent mechanisms: Involvement of platelet TLR2 and TLR4, *Blood*. 118 (2011) 1952–1961. doi:10.1182/blood-2011-03-343061.
- [57] S. Barranco-Medina, N. Pozzi, A.D. Vogt, E. Di Cera, Histone H4 promotes prothrombin autoactivation, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 35749–35757. doi:10.1074/jbc.M113.509786.
- [58] J. Yang, L. Zhang, C. Yu, X.F. Yang, H. Wang, Monocyte and macrophage differentiation: Circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases, *Biomark. Res.* (2014). doi:10.1186/2050-7771-2-1.
- [59] T.W. Muhlfelder, J. Niemetz, D. Kreutzer, D. Beebe, P.A. Ward, S.I. Rosenfeld, C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity. A link between complement and coagulation, *J. Clin. Invest.* 63 (1979) 147–150. doi:10.1172/JCI109269.
- [60] C.J.W. van Ginkel, W.G. van Aken, J.I.H. Oh, J. Vreeken, Stimulation of Monocyte Procoagulant Activity by Adherence to Different Surfaces, *Br. J. Haematol.* 37 (1977) 35–45. doi:10.1111/j.1365-2141.1977.tb08809.x.
- [61] Y. Nemerson, Tissue factor and hemostasis., *Blood*. 71 (1988) 1–8.
- [62] T.A. Drake, J.H. Morrissey, T.S. Edgington, Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis., *Am. J. Pathol.* (1989).
- [63] N. Mackman, Regulation of the tissue factor gene, *FASEB J.* 9 (1995) 883–9.
- [64] H. Schwertz, N.D. Tolley, J.M. Foulks, M.M. Denis, B.W. Risenmay, M. Buerke, R.E.

- Tilley, M.T. Rondina, E.M. Harris, L.W. Kraiss, N. Mackman, G.A. Zimmerman, A.S. Weyrich, Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets, *J. Exp. Med.* 203 (2006) 2433–2440. doi:10.1084/jem.20061302.
- [65] I. Müller, A. Klocke, M. Alex, M. Kotzsch, T. Luther, E. Morgenstern, S. Zieseniss, S. Zahler, K. Preissner, B. Engelmann, Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets., *FASEB J.* (2003). doi:10.1096/fj.02-0574fje.
- [66] B. Østerud, E. Bjørklid, Sources of Tissue Factor, *Semin. Thromb. Hemost.* (2006). doi:10.1055/s-2006-933336.
- [67] H. Todoroki, S. Nakamura, A. Higure, K. Okamoto, S. Takeda, N. Nagata, H. Itoh, K. Ohsato, Neutrophils express tissue factor in a monkey model of sepsis, *Surgery.* 127 (2000) 209–216. doi:10.1067/msy.2000.103027.
- [68] R. Darbousset, G.M. Thomas, S. Mezouar, C. Frère, R. Bonier, N. Mackman, T. Renné, F. Dignat-George, C. Dubois, L. Panicot-Dubois, Tissue factor-positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation, *Blood.* 120 (2012) 2133–2143. doi:10.1182/blood-2012-06-437772.
- [69] G.C.N. Parry, N. Mackman, Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15 (1995) 612–621. doi:10.1161/01.ATV.15.5.612.
- [70] H. Tang, L. Ivanciu, N. Popescu, G. Peer, E. Hack, C. Lupu, F.B. Taylor, F. Lupu, Sepsis-induced coagulation in the baboon lung is associated with decreased tissue factor pathway inhibitor, *Am. J. Pathol.* 171 (2007) 1066–1077. doi:10.2353/ajpath.2007.070104.
- [71] P.L.A. Giesen, U. Rauch, B. Bohrmann, D. Kling, M. Roqué, J.T. Fallon, J.J. Badimon, J. Himber, M.A. Riederer, Y. Nemerson, Blood-borne tissue factor: Another view of thrombosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96 (1999) 2311–2315. doi:10.1073/pnas.96.5.2311.
- [72] M. Guha, N. Mackman, LPS induction of gene expression in human monocytes, *Cell. Signal.* 13 (2001) 85–94. doi:10.1016/S0898-6568(00)00149-2.
- [73] A.S. Wolberg, D.M. Monroe, H.R. Roberts, M.R. Hoffman, Tissue factor

- de-encryption: ionophore treatment induces changes in tissue factor activity by phosphatidylserine-dependent and -independent mechanisms, *Blood Coagul. Fibrinolysis*. 10 (1999) 201–210.
- [74] E.M. Egorina, M.A. Sovershaev, G. Bjørkøy, F.X.E. Gruber, J.O. Olsen, B. Parhami-Seren, K.G. Mann, B. Østerud, Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: Application to intersubject variability, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1493–1498. doi:10.1161/01.ATV.0000168413.29874.d7.
- [75] S. Butenas, J. Krudysz-Amblo, Decryption of tissue factor, *Thromb. Res.* 129 (2012). doi:10.1016/j.thromres.2012.02.022.
- [76] R.R. Bach, Tissue factor encryption, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 456–461. doi:10.1161/01.ATV.0000202656.53964.04.
- [77] R.R. Bach, C.F. Moldow, Mechanism of tissue factor activation on HL-60 cells., *Blood*. 89 (1997) 3270–3276. doi:10.1590/s0104-530x2011000200012.
- [78] C. Kunzelmann-Marche, N. Satta, F. Toti, Y. Zhang, P.P. Nawroth, J.H. Morrissey, J.M. Freyssinet, The influence exerted by a restricted phospholipid microenvironment on the expression of tissue factor activity at the cell plasma membrane surface, *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 282–289. doi:00020282 [pii].
- [79] D.W. Banner, A. D’Arcy, C. Chène, F.K. Winkler, A. Guha, W.H. Konigsberg, Y. Nemerson, D. Kirchhofer, The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor, *Nature*. 380 (1996) 41–46. doi:10.1038/380041a0.
- [80] E.W. Greeno, R.R. Bach, C.F. Moldow, Apoptosis is associated with increased cell surface tissue factor procoagulant activity, *Lab. Investig.* 75 (1996) 281–289.
- [81] A.W. Shaw, V.S. Pureza, S.G. Sligar, J.H. Morrissey, The local phospholipid environment modulates the activation of blood clotting, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 6556–6563. doi:10.1074/jbc.M607973200.
- [82] N. Tavoosi, R.L. Davis-Harrison, T. V. Pogorelov, Y.Z. Ohkubo, M.J. Arcario, M.C. Clay, C.M. Rienstra, E. Tajkhorshid, J.H. Morrissey, Molecular determinants of phospholipid synergy in blood clotting, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 23247–23253. doi:10.1074/jbc.M111.251769.

- [83] A. Rehemtulla, W. Ruf, T.S. Edgington, The integrity of the cysteine 186-cysteine 209 bond of the second disulfide loop of tissue factor is required for binding of factor VII, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 10294–10299.
- [84] L.G. Van Den Hengel, B. Kocatürk, P.H. Reitsma, W. Ruf, H.H. Versteeg, Complete abolishment of coagulant activity in monomeric disulfide-deficient tissue factor, *Blood*. 118 (2011) 3446–3448. doi:10.1182/blood-2011-06-364612.
- [85] C. Reinhardt, M.L. Von Brühl, D. Manukyan, L. Grahl, M. Lorenz, B. Altmann, S. Dlugai, S. Hess, I. Konrad, L. Orschiedt, N. Mackman, L. Ruddock, S. Massberg, B. Engelmann, Protein disulfide isomerase acts as an injury response signal that enhances fibrin generation via tissue factor activation, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 1110–1122. doi:10.1172/JCI32376.
- [86] J. Cho, B.C. Furie, S.R. Coughlin, B. Furie, A critical role for extracellular protein disulfide isomerase during thrombus formation in mice, *J. Clin. Invest.* (2008). doi:10.1172/JCI34134.
- [87] B.A. Bouchard, P.B. Tracy, Platelets, leukocytes, and coagulation, *Curr. Opin. Hematol.* 8 (2001) 263–269. doi:10.1097/00062752-200109000-00001.
- [88] P. Libby, P.M. Ridker, G.K. Hansson, Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis, *Nature*. (2011). doi:10.1038/nature10146.
- [89] H. Breme, V. Biehl, N. Reger, E. Gawalt, A metallic biomaterials: introduction, *Handb. Biomater. Prop.* (2016) 151–158.
- [90] B. Patel, G. Favaro, F. Inam, M.J. Reece, A. Angadji, W. Bonfield, J. Huang, M. Edirisinghe, Cobalt-based orthopaedic alloys: Relationship between forming route, microstructure and tribological performance, *Mater. Sci. Eng. C.* 32 (2012) 1222–1229. doi:10.1016/j.msec.2012.03.012.
- [91] S.K. Jaganathan, E. Supriyanto, S. Murugesan, A. Balaji, M.K. Asokan, Biomaterials in cardiovascular research: Applications and clinical implications, *Biomed Res. Int.* (2014). doi:10.1155/2014/459465.
- [92] T. Hanawa, Materials for metallic stents, *J. Artif. Organs.* 12 (2009) 73–79. doi:10.1007/s10047-008-0456-x.
- [93] S.V. Muley, A.N. Vidvans, G.P. Chaudhari, S. Udainiya, An assessment of ultra fine

- grained 316L stainless steel for implant applications, *Acta Biomater.* 30 (2016) 408–419. doi:10.1016/j.actbio.2015.10.043.
- [94] J. Liu, X. Wang, B.J. Wu, T.F. Zhang, Y.X. Leng, N. Huang, Tribocorrosion behavior of DLC-coated CoCrMo alloy in simulated biological environment, *Vacuum.* 92 (2013) 39–43. doi:10.1016/j.vacuum.2012.11.017.
- [95] M. Catauro, F. Bollino, F. Papale, R. Giovanardi, P. Veronesi, Corrosion behavior and mechanical properties of bioactive sol-gel coatings on titanium implants, *Mater. Sci. Eng. C.* (2014). doi:10.1016/j.msec.2014.07.044.
- [96] A.S. Koh, L.M. Choi, L.L. Sim, J.W. Tan, L.W. Khin, T.S.J. Chua, T.H. Koh, S. Chia, Comparing the use of cobalt chromium stents to stainless steel stents in primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: A prospective registry, *Acute Card. Care.* 13 (2011) 219–222. doi:10.3109/17482941.2011.634011.
- [97] B.J. O'Brien, J.S. Stinson, S.R. Larsen, M.J. Eppihimer, W.M. Carroll, A platinum-chromium steel for cardiovascular stents, *Biomaterials.* 31 (2010) 3755–3761. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.146.
- [98] A. Kastrati, J. Mehilli, J. Dirschinger, F. Dotzer, H. Schühlen, F. Neumann, M. Fleckenstein, C. Pfafferott, M. Seyfarth, A. Schömig, Intracoronary stenting and angiographic results: Strut thickness effect on restenosis outcome (ISAR-STEREO-2) trial, *Circulation.* 103 (2001) 2816–2821. doi:10.1016/S0735-1097(03)00119-0.
- [99] C. Simon, J.C. Palmaz, E. Sprague, Influence of Topography on Endothelialization of Stents: Clues for New Designs, *J. Long. Term. Eff. Med. Implants.* 10 (2000) 143–151. doi:10.1615/v10.i12.120.
- [100] F. Nazneen, G. Herzog, D.W.M. Arrigan, N. Caplice, P. Benvenuto, P. Galvin, M. Thompson, Surface chemical and physical modification in stent technology for the treatment of coronary artery disease, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 100 B (2012) 1989–2014. doi:10.1002/jbm.b.32772.
- [101] U. Sigwart, J. Puel, V. Mirkovitch, F. Joffre, L. Kappenberger, Intravascular Stents to Prevent Occlusion and Re-Stenosis after Transluminal Angioplasty, *N. Engl. J. Med.* (1987). doi:10.1056/NEJM198703193161201.
- [102] B. Tesfamariam, Platelet function in intravascular device implant-induced intimal

- injury, *Cardiovasc. Revascularization Med.* 9 (2008) 78–87.  
doi:10.1016/j.carrev.2007.12.001.
- [103] J.C. Palmaz, Bring that pioneering spirit back! A 25-year perspective on the vascular stent, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 30 (2007) 1095–1098. doi:10.1007/s00270-007-9164-9.
- [104] M. Joner, A. V. Finn, A. Farb, E.K. Mont, F.D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H.K. Gold, R. Virmani, Pathology of Drug-Eluting Stents in Humans. Delayed Healing and Late Thrombotic Risk, *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 193–202.  
doi:10.1016/j.jacc.2006.03.042.
- [105] M.-C. Morice, P.W. Serruys, J.E. Sousa, J. Fajadet, E. Ban Hayashi, M. Perin, A. Colombo, G. Schuler, P. Barragan, G. Guagliumi, F. Molnàr, R. Falotico, A Randomized Comparison of a Sirolimus-Eluting Stent with a Standard Stent for Coronary Revascularization, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) 1773–1780.  
doi:10.1056/NEJMoa012843.
- [106] A. Colombo, J. Drzewiecki, A. Banning, E. Grube, K. Hauptmann, S. Silber, D. Dudek, S. Fort, F. Schiele, K. Zmudka, G. Guagliumi, M.E. Russell, Randomized study to assess the effectiveness of slow- and moderate-release polymer-based paclitaxel-eluting stents for coronary artery lesions, *Circulation.* (2003).  
doi:10.1161/01.CIR.0000086926.62288.A6.
- [107] J. Riegger, R.A. Byrne, M. Joner, S. Chandraratne, A.H. Gershlick, J.M. Ten Berg, T. Adriaenssens, G. Guagliumi, T.C. Godschalk, F.J. Neumann, D. Trenk, L.J. Feldman, P.G. Steg, W. Desmet, F. Alfonso, A.H. Goodall, R. Wojdyla, D. Dudek, V. Philippi, S. Opinaldo, A. Titova, N. Malik, J. Cotton, D.A. Jhagroe, A.A.C.M. Heestermans, P. Sinnaeve, P. Vermeersch, C. Valina, C. Schulz, A. Kastrati, S. Massberg, I. Buyschaert, M. Chausson, D. De Cock, J. Dens, E. Barbato, S. Gautier, H. Abergel, M. Jandrot-Perrus, D. Letourneur, P. Mangin, V. Ollivier, C. Roques, M. Gratz, E. Kennerknecht, I. Konrad, T. Koppa, V. Ntziachristos, A. Rosenthal, A. Rzany, K. Steigerwald, T. Tada, A. Vogelsang, E. Xhepa, C. Bernelli, M. Coccato, K. Komukai, V. Sirbu, G. Kerch, G. Amoroso, W.J.M. Dewilde, A.A.C.M. Heestermans, J.J. Wykrzykowska, M.H.M. Winkens, A. Rzeszutko, W. Zasada, J. Cuesta, M. Medina, C. Berry, N. Curzen, M. McEntegart, R. Gerber, S. Hetherington, J. Hill, D. Kelly, K. Oldroyd, H. Routledge, J. Shannon, V. Suresh, A. Zahman, *Histopathological*



- evaluation of thrombus in patients presenting with stent thrombosis. A multicenter European study: A report of the prevention of late stent thrombosis by an interdisciplinary global European effort consortium, *Eur. Heart J.* (2016). doi:10.1093/eurheartj/ehv419.
- [108] E. Pasquier, M. Carré, B. Pourroy, L. Camoin, O. Rebaï, C. Briand, D. Braguer, Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway., *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 1301–1310. doi:3/10/1301 [pii].
- [109] N. Foin, R.D. Lee, R. Torii, J.L. Guitierrez-Chico, A. Mattesini, S. Nijjer, S. Sen, R. Petraco, J.E. Davies, C. Di Mario, M. Joner, R. Virmani, P. Wong, Impact of stent strut design in metallic stents and biodegradable scaffolds, *Int. J. Cardiol.* (2014). doi:10.1016/j.ijcard.2014.09.143.
- [110] R. Waksman, R. Pakala, P.K. Kuchulakanti, R. Baffour, D. Hellinga, R. Seabron, F.O. Tio, E. Wittchow, S. Hartwig, C. Harder, R. Rohde, B. Heublein, A. Andreae, K.H. Waldmann, A. Haverich, Safety and efficacy of bioabsorbable magnesium alloy stents in porcine coronary arteries, *Catheter. Cardiovasc. Interv.* 68 (2006) 607–617. doi:10.1002/ccd.20727.
- [111] R. Erbel, C. Di Mario, J. Bartunek, J. Bonnier, B. de Bruyne, F.R. Eberli, P. Erne, M. Haude, B. Heublein, M. Horrigan, C. Ilsley, D. Böse, J. Koolen, T.F. Lüscher, N. Weissman, R. Waksman, Temporary scaffolding of coronary arteries with bioabsorbable magnesium stents: a prospective, non-randomised multicentre trial, *Lancet.* (2007). doi:10.1016/S0140-6736(07)60853-8.
- [112] D.W. Park, S.W. Park, K.H. Park, B.K. Lee, Y.H. Kim, C.W. Lee, M.K. Hong, J.J. Kim, S.J. Park, Frequency of and Risk Factors for Stent Thrombosis After Drug-Eluting Stent Implantation During Long-Term Follow-Up, *Am. J. Cardiol.* (2006). doi:10.1016/j.amjcard.2006.02.039.
- [113] E.P. McFadden, E. Stabile, E. Regar, E. Cheneau, A.T.L. Ong, T. Kinnaird, W.O. Suddath, N.J. Weissman, R. Torguson, K.M. Kent, A.D. Pichard, L.F. Satler, R. Waksman, P.W. Serruys, Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy, *Lancet.* (2004). doi:10.1016/S0140-6736(04)17275-9.

- [114] A. V. Finn, M. Joner, G. Nakazawa, F. Kolodgie, J. Newell, M.C. John, H.K. Gold, R. Virmani, Pathological correlates of late drug-eluting stent thrombosis: Strut coverage as a marker of endothelialization, *Circulation*. 115 (2007) 2435–2441.  
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.107.693739.
- [115] S.H. Hofma, W.J. Van Der Giessen, B.M. Van Dalen, P.A. Lemos, E.P. McFadden, G. Sianos, J.M.R. Ligthart, D. Van Essen, P.J. De Feyter, P.W. Serruys, Indication of long-term endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation, *Eur. Heart J.* (2006). doi:10.1093/eurheartj/ehi571.
- [116] R. Virmani, G. Guagliumi, A. Farb, G. Musumeci, N. Grieco, T. Motta, L. Mihalcsik, M. Tsepili, O. Valsecchi, F.D. Kolodgie, Localized Hypersensitivity and Late Coronary Thrombosis Secondary to a Sirolimus-Eluting Stent: Should We Be Cautious?, *Circulation*. 109 (2004) 701–705. doi:10.1161/01.CIR.0000116202.41966.D4.
- [117] M.T. Castagna, G.S. Mintz, B.O. Leiboff, J.M. Ahmed, R. Mehran, L.F. Satler, K.M. Kent, A.D. Pichard, N.J. Weissman, The contribution of “mechanical” problems to in-stent restenosis: An intravascular ultrasonographic analysis of 1090 consecutive in-stent restenosis lesions, *Am. Heart J.* (2001). doi:10.1067/mhj.2001.119613.
- [118] P. Serruys, J. Daemen, Are drug-eluting stents associated with a higher rate of late thrombosis than bare metal stents? Late stent thrombosis: a nuisance in both bare metal and drug-eluting stents, *Circulation*. 115 (2007) 1433–1439.
- [119] R.E. Harskamp, R.D. Lopes, C.E. Baisden, R.J. De Winter, J.H. Alexander, Saphenous vein graft failure after coronary artery bypass surgery: Pathophysiology, management, and future directions, *Ann. Surg.* 257 (2013) 824–833.  
doi:10.1097/SLA.0b013e318288c38d.
- [120] H. Bergmeister, M. Strobl, C. Grasl, R. Liska, H. Schima, Tissue engineering of vascular grafts, *Eur. Surg. - Acta Chir. Austriaca*. 45 (2013) 187–193.  
doi:10.1007/s10353-013-0224-x.
- [121] V. Ollivier, J. Wang, D. Manly, K.R. Machlus, A.S. Wolberg, M. Jandrot-Perrus, N. Mackman, Detection of endogenous tissue factor levels in plasma using the calibrated automated thrombogram assay, *Thromb. Res.* (2010).  
doi:10.1016/j.thromres.2009.03.003.
- [122] B. Yashiro, M. Shoda, Y. Tomizawa, T. Manaka, N. Hagiwara, Long-term results of a

- cardiovascular implantable electronic device wrapped with an expanded polytetrafluoroethylene sheet, *J. Artif. Organs.* 15 (2012) 244–249.  
doi:10.1007/s10047-012-0634-8.
- [123] T.O. Verbelen, N. Famaey, M. Gewillig, F.R. Rega, B. Meyns, Off-label use of stretchable polytetrafluoroethylene: Overexpansion of synthetic shunts, *Int. J. Artif. Organs.* 33 (2010) 263–270. doi:FE70D242-AD92-4568-ABD8-DCCA1FFDF286 [pii].
- [124] N. Nagano, R. Cartier, T. Zigras, R. Mongrain, R.L. Leask, Mechanical properties and microscopic findings of a Dacron graft explanted 27 years after coarctation repair, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 134 (2007) 1577–1578. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.08.005.
- [125] L. Bordenave, P. Menu, C. Baquey, Developments towards tissue-engineered, small-diameter arterial substitutes, *Expert Rev. Med. Devices.* 5 (2008) 337–347.  
doi:10.1586/17434440.5.3.337.
- [126] F.J. Schoen, R.F. Padera, *Endovascular Stents, Vascular Grafts, and Stent Grafts, Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Third Ed.* (2011) 771–784. doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00068-1.
- [127] I. Junkar, M. Kulkarni, P. Humpolíček, Z. Capáková, B. Burja, A. Mazare, P. Schmuki, K. Mrak-Poljšak, A. Flašker, P. Žigon, S. Čučnik, M. Mozetič, M. Tomšič, A. Iglič, S. Sodin-Semrl, Could titanium dioxide nanotubes represent a viable support system for appropriate cells in vascular implants?, *Adv. Biomembr. Lipid Self-Assembly.* (2017). doi:10.1016/bs.abl.2016.12.001.
- [128] R. Ogawa, K. Oki, H. Hyakusoku, Vascular tissue engineering and vascularized 3D tissue regeneration, *Regen Med.* 2 (2007) 831–837.
- [129] W. Zhang, W. Liu, L. Cui, Y. Cao, Tissue engineering of blood vessel, *J Cell Mol Med.* 11 (2007) 945–957.
- [130] N. Caplice, Biologics alternatives to stents and graft, *Curr Cardiol Rep.* 3 (2001) 17–21.
- [131] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: Competition from mixtures and the Vroman effect, *Biomaterials.* 28 (2007) 405–422.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2006.09.006.

- [132] L. Vroman, A.L. Adams, Findings with recording ellipsometer suggesting rapid exchange of specific plasma proteins at liquid/solid interfaces, *Surf. Sci.* 16 (1969).
- [133] S.L. Hirsh, D.R. McKenzie, N.J. Nosworthy, J.A. Denman, O.U. Sezerman, M.M.M. Bilek, The Vroman effect: Competitive protein exchange with dynamic multilayer protein aggregates, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 103 (2013) 395–404. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.10.039.
- [134] K. Nakanishi, T. Sakiyama, K. Imamura, On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon, *J. Biosci. Bioeng.* 91 (2001) 233–244. doi:10.1016/S1389-1723(01)80127-4.
- [135] K.C. Dee, D.A. Puleo, R. Bizios, *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions Protein-Surface Interactions*, 2002. doi:10.1002/0471270598.
- [136] P. Roach, D. Farrar, C.C. Perry, Surface tailoring for controlled protein adsorption: Effect of topography at the nanometer scale and chemistry, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 3939–3945. doi:10.1021/ja056278e.
- [137] D.L. Elbert, J.A. Hubbell, Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility, *Annu. Rev. Mater. Sci.* 26 (1996) 365–394. doi:10.1146/annurev.ms.26.080196.002053.
- [138] A. Krishnan, P. Cha, Y.H. Liu, D. Allara, E.A. Vogler, Interfacial energetics of blood plasma and serum adsorption to a hydrophobic self-assembled monolayer surface, *Biomaterials*. 27 (2006) 3187–3194. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.12.032.
- [139] E. Luong-Van, I. Rodriguez, H.Y. Low, N. Elmouelhi, B. Lowenhaupt, S. Natarajan, C.T. Lim, R. Prajapati, M. Vyakarnam, K. Cooper, Review: Micro- and nanostructured surface engineering for biomedical applications, *J. Mater. Res.* 28 (2013) 165–174. doi:10.1557/jmr.2012.398.
- [140] P. Thevenot, W. Hu, L. Tang, Surface chemistry influences implant biocompatibility., *Curr Top Med Chem.* 8 (2008) 270–280. doi:10.2174/156802608783790901.
- [141] P. Roach, D. Eglin, K. Rohde, C.C. Perry, Modern biomaterials: A review - Bulk properties and implications of surface modifications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18 (2007) 1263–1277. doi:10.1007/s10856-006-0064-3.
- [142] E.A. Vogler, J.C. Graper, G.R. Harper, H.W. Sugg, L.M. Lander, W.J. Brittain, Contact activation of the plasma coagulation cascade. I. Procoagulant surface

- chemistry and energy, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 1005–1016.  
doi:10.1002/jbm.820290813.
- [143] A. Golas, P. Parhi, Z.O. Dimachkie, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Surface-energy dependent contact activation of blood factor XII, *Biomaterials*. 31 (2010) 1068–1079.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2009.10.039.
- [144] R. Zhuo, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Autoactivation of blood factor XII at hydrophilic and hydrophobic surfaces, *Biomaterials*. 27 (2006) 4325–4332.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2006.04.001.
- [145] M.A. Griep, K. Fujikawa, G.L. Nelsestuen, Possible Basis for the Apparent Surface Selectivity of the Contact Activation of Human Blood Coagulation Factor XII, *Biochemistry*. 25 (1986) 6688–6694. doi:10.1021/bi00369a054.
- [146] K.A. Mitropoulos, High affinity binding of factor XIIa to an electronegative surface controls the rates of factor XII and prekallikrein activation in vitro, *Thromb. Res.* 94 (1999) 117–129. doi:10.1016/S0049-3848(98)00207-2.
- [147] K. Chatterjee, J.L. Thornton, J.W. Bauer, E.A. Vogler, Moderation of Prekallikrein-Factor XII Interactions in Surface Activation of Coagulation by Protein-Adsorption Competition, *Biomaterials*. 30 (2009) 4915–4920.  
doi:10.1016/j.biomaterials.2009.05.076.
- [148] K.W.H.J. van der Kamp, K.D. Hauch, J. Feijen, T.A. Horbett, Contact activation during incubation of five different polyurethanes or glass in plasma, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 1303–1306. doi:10.1002/jbm.820291018.
- [149] J. Hong, K. Nilsson Ekdahl, H. Reynolds, R. Larsson, B. Nilsson, A new in vitro model to study interaction between whole blood and biomaterials. Studies of platelet and coagulation activation and the effect of aspirin, *Biomaterials*. (1999).  
doi:10.1016/S0142-9612(98)00210-5.
- [150] S.N. Christo, K.R. Diener, A. Bachhuka, K. Vasilev, J.D. Hayball, Innate Immunity and Biomaterials at the Nexus: Friends or Foes, *Biomed Res. Int.* 2015 (2015) 342304.  
doi:10.1155/2015/342304.
- [151] A. Zarbock, R.K. Polanowska-Grabowska, K. Ley, Platelet-neutrophil-interactions: Linking hemostasis and inflammation, *Blood Rev.* 21 (2007) 99–111.

doi:10.1016/j.blre.2006.06.001.

- [152] A. Hidalgo, J. Chang, J.E. Jang, A.J. Peired, E.Y. Chiang, P.S. Frenette, Heterotypic interactions enabled by polarized neutrophil microdomains mediate thromboinflammatory injury, *Nat. Med.* 15 (2009) 384–391. doi:10.1038/nm.1939.
- [153] E. Kolaczowska, P. Kubes, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 159–175. doi:10.1038/nri3399.
- [154] G. Nimeri, M. Majeed, H. Elwing, L. Ohman, J. Wetterö, T. Bengtsson, Oxygen radical production in neutrophils interacting with platelets and surface-immobilized plasma proteins: role of tyrosine phosphorylation., *J. Biomed. Mater. Res. A.* 67 (2003) 439–47. doi:10.1002/jbm.a.10081.
- [155] J. Wetterö, T. Bengtsson, P. Tengvall, Complement activation on immunoglobulin G-coated hydrophobic surfaces enhances the release of oxygen radicals from neutrophils through an actin-dependent mechanism, *J. Biomed. Mater. Res.* 51 (2000) 742–751. doi:10.1002/1097-4636(20000915)51:4<742::AID-JBM24>3.0.CO;2-D.
- [156] S.L. Wong, M. Demers, K. Martinod, M. Gallant, Y. Wang, A.B. Goldfine, C.R. Kahn, D.D. Wagner, Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing, *Nat. Med.* 21 (2015) 815–819. doi:10.1038/nm.3887.
- [157] J. V. Dovi, Accelerated wound closure in neutrophil-depleted mice, *J. Leukoc. Biol.* 73 (2003) 448–455. doi:10.1189/jlb.0802406.
- [158] M.B. Gorbet, E.L. Yeo, M. V. Sefton, Flow cytometric study of in vitro neutrophil activation by biomaterials, *J. Biomed. Mater. Res.* 44 (1999) 289–297. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19990305)44:3<289::AID-JBM7>3.0.CO;2-O.
- [159] F. Suska, M. Esposito, C. Gretzer, M. Källtorp, P. Tengvall, P. Thomsen, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  secretion during in vivo/ex vivo cellular interactions with titanium and copper, *Biomaterials.* 24 (2003) 461–468. doi:10.1016/S0142-9612(02)00359-9.
- [160] J.R. Woolley, J.J. Teuteberg, C.A. Bermudez, J.K. Bhama, K.L. Lockard, R.L. Kormos, W.R. Wagner, Temporal leukocyte numbers and granulocyte activation in pulsatile and rotary ventricular assist device patients, *Artif. Organs.* 38 (2014) 447–455. doi:10.1111/aor.12200.
- [161] V. Kumar, A. Sharma, Neutrophils: Cinderella of innate immune system, *Int.*

- Immunopharmacol. (2010). doi:10.1016/j.intimp.2010.08.012.
- [162] J. Chung, N. Gikakis, K. Rao, T. Drake, R. Colman, L. Edmunds, Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation*, *Circulation*. 93 (1996) 2014–2018.
- [163] M.B. Gorbet, M. V. Sefton, Leukocyte activation and leukocyte procoagulant activities after blood contact with polystyrene and polyethylene glycol-immobilized polystyrene beads, *J. Lab. Clin. Med.* 137 (2001) 345–355. doi:10.1067/mlc.2001.114677.
- [164] P.S. Wolfe, P. Madurantakam, K. Garg, S.A. Sell, M.J. Beckman, G.L. Bowlin, Evaluation of thrombogenic potential of electrospun bioresorbable vascular graft materials: Acute monocyte tissue factor expression, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. (2010). doi:10.1002/jbm.a.32458.
- [165] M. Fischer, C. Sperling, P. Tengvall, C. Werner, The ability of surface characteristics of materials to trigger leukocyte tissue factor expression, *Biomaterials*. (2010). doi:10.1016/j.biomaterials.2009.12.016.
- [166] D.A. Raybagkar, S. Patchipulusu, A.E. Mast, C.L. Hall, In vitro flow evaluation of recombinant tissue factor pathway inhibitor immobilized on collagen impregnated Dacron, *ASAIO J.* (2004). doi:10.1097/01.MAT.0000132261.38356.5A.
- [167] J. Kappelmayr, A. Bernabei, L.H. Edmunds, T.S. Edgington, R.W. Colman, Tissue factor is expressed on monocytes during simulated extracorporeal circulation, *Circ. Res.* 72 (1993) 1075–1081. doi:10.1161/01.RES.72.5.1075.
- [168] T. Palmerini, B.S. Coller, V. Cervi, L. Tomasi, A. Marzocchi, C. Marrozzini, O. Leone, M. Piccioli, A. Branzi, Monocyte-derived tissue factor contributes to stent thrombosis in an in vitro system, *J. Am. Coll. Cardiol.* (2004). doi:10.1016/j.jacc.2004.07.028.
- [169] B. Furie, B.C. Furie, Role of platelet P-selectin and microparticle PSGL-1 in thrombus formation, *Trends Mol. Med.* (2004). doi:10.1016/j.molmed.2004.02.008.
- [170] E.R. Vandendries, B.C. Furie, B. Furie, Role of P-selectin and PSGL-I in coagulation and thrombosis, *Thromb. Haemost.* (2004). doi:10.1160/TH04-05-0306.
- [171] S. Falati, Q. Liu, P. Gross, G. Merrill-Skoloff, J. Chou, E. Vandendries, A. Celi, K. Croce, B.C. Furie, B. Furie, Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi In Vivo Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and

- Platelet P-Selectin, *J. Exp. Med.* (2003). doi:10.1084/jem.20021868.
- [172] Z. Sheikh, P.J. Brooks, O. Barzilay, N. Fine, M. Glogauer, Macrophages, foreign body giant cells and their response to implantable biomaterials, *Materials (Basel)*. (2015) 5671–5701. doi:10.3390/ma8095269.
- [173] S. Browne, A. Pandit, Biomaterial-Mediated Modification of the Local Inflammatory Environment, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3 (2015) 67. doi:10.3389/fbioe.2015.00067.
- [174] J.A. Jones, D.T. Chang, H. Meyerson, E. Colton, K.K. II, T. Matsuda, J.M. Anderson, Proteomic analysis and quantification of cytokines and chemokines from biomaterial surface-adherent macrophages and foreign body giant cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 83 (2007) 585–596. doi:10.1002/jbm.a.31221.
- [175] T.O. Collier, J.M. Anderson, Protein and surface effects on monocyte and macrophage adhesion, maturation, and survival, *J. Biomed. Mater. Res.* 60 (2002) 487–496. doi:10.1002/jbm.10043.
- [176] D.R. Schmidt, W.J. Kao, Monocyte activation in response to polyethylene glycol hydrogels grafted with RGD and PHSRN separated by interpositional spacers of various lengths, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 83 (2007) 617–625. doi:10.1002/jbm.a.31270.
- [177] J. Maciel, M.I. Oliveira, E. Colton, A.K. McNally, C. Oliveira, J.M. Anderson, M.A. Barbosa, Adsorbed Fibrinogen Enhances Production of Bone- and Angiogenic-Related Factors by Monocytes/Macrophages, *Tissue Eng. Part A*. 20 (2014) 250–263. doi:10.1089/ten.tea.2012.0439.
- [178] C.R. Jenney, J.M. Anderson, Adsorbed serum proteins responsible for surface dependent human macrophage behavior, *J. Biomed. Mater. Res.* 49 (2000) 435–447. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(20000315)49:4<435::AID-JBM2>3.0.CO;2-Y.
- [179] J.K. Kim, E.A. Scott, D.L. Elbert, Proteomic analysis of protein adsorption: Serum amyloid P adsorbs to materials and promotes leukocyte adhesion, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 75 (2005) 199–209. doi:10.1002/jbm.a.30424.
- [180] B.N. Brown, B.D. Ratner, S.B. Goodman, S. Amar, S.F. Badylak, Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine, *Biomaterials*. 33 (2012) 3792–3802. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.034.



- [181] M.L. Novak, T.J. Koh, Macrophage phenotypes during tissue repair, *J. Leukoc. Biol.* 93 (2013) 875–881. doi:10.1189/jlb.1012512.
- [182] D.M. Mosser, J.P. Edwards, Exploring the full spectrum of macrophage activation, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 958–969. doi:10.1038/nri2448.
- [183] W.G. Brodbeck, J. Patel, G. Voskerician, E. Christenson, M.S. Shive, Y. Nakayama, T. Matsuda, N.P. Ziats, J.M. Anderson, Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 10287–10292. doi:10.1073/pnas.162124199.
- [184] H. Waldeck, X. Wang, E. Joyce, W.J. Kao, Active leukocyte detachment and apoptosis/necrosis on PEG hydrogels and the implication in the host inflammatory response, *Biomaterials.* 33 (2012) 29–37. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.09.044.
- [185] A.K. Refai, M. Textor, D.M. Brunette, J.D. Waterfield, Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 70 (2004) 194–205. doi:10.1002/jbm.a.30075.
- [186] W.G. Brodbeck, Y. Nakayama, T. Matsuda, E. Colton, N.P. Ziats, J.M. Anderson, Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro, *Cytokine.* 18 (2002) 311–319. doi:10.1006/cyto.2002.1048.
- [187] D.M. Underhill, H.S. Goodridge, Information processing during phagocytosis, *Nat. Rev. Immunol.* 12 (2012) 492–502. doi:10.1038/nri3244.
- [188] A.M. Labrousse, E. Meunier, J. Record, A. Labernadie, A. Beduer, C. Vieu, T. Ben Safta, I. Maridonneau-Parini, Frustrated phagocytosis on micro-patterned immune complexes to characterize lysosome movements in live macrophages, *Front. Immunol.* 2 (2011) 51. doi:10.3389/fimmu.2011.0005.
- [189] P.R. Burd, W.C. Thompson, E.E. Max, F.C. Mills, Activated mast cells produce interleukin 13., *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1373–1380. doi:10.1084/jem.181.4.1373.
- [190] R. Venkayya, M. Lam, M. Willkom, G. Grünig, D.B. Corry, D.J. Erle, The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002) 202–208. doi:10.1165/ajrcmb.26.2.4600.

- [191] A.K. McNally, J.M. Anderson, Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells, *Am J Pathol.* 147 (1995) 1487–1499.
- [192] W.J. Kao, A.K. McNally, A. Hiltner, J.M. Anderson, Role for interleukin-4 in foreign-body giant cell formation on a poly(etherurethane urea) in vivo, *J. Biomed. Mater. Res.* 29 (1995) 1267–1275. doi:10.1002/jbm.820291014.
- [193] K.M. DeFife, C.R. Jenney, A.K. McNally, E. Colton, J.M. Anderson, Interleukin-13 Induces Human Monocyte/Macrophage Fusion and Macrophage Mannose Receptor Expression, *J. Immunol.* 158 (1997) 3385–3390.
- [194] A.K. McNally, K.M. DeFife, J.M. Anderson, Interleukin-4-induced macrophage fusion is prevented by inhibitors of mannose receptor activity, *Am. J. Pathol.* 149 (1996) 975–985.
- [195] L.A. Matheson, J.P. Santerre, R.S. Labow, Changes in Macrophage Function and Morphology due to Biomedical Polyurethane Surfaces Undergoing Biodegradation, *J. Cell. Physiol.* 199 (2004) 8–19. doi:10.1002/jcp.10412.
- [196] R.J. Pitsch, D.J. Minion, M.L. Goman, J.A. Van Aalst, P.L. Fox, L.M. Graham, Platelet-derived growth factor production by cells from Dacron grafts implanted in a canine model, *J. Vasc. Surg.* 26 (1997) 70–78. doi:10.1016/S0741-5214(97)70149-6.
- [197] P. Bao, A. Kodra, M. Tomic-Canic, M.S. Golinko, H.P. Ehrlich, H. Brem, The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing, *J. Surg. Res.* 153 (2009) 347–358. doi:10.1016/j.jss.2008.04.023.
- [198] K. Garg, S.A. Sell, P. Madurantakam, G.L. Bowlin, Angiogenic potential of human macrophages on electrospun bioresorbable vascular grafts, *Biomed. Mater.* 4 (2009) Article ID 031001. doi:10.1088/1748-6041/4/3/031001.
- [199] T.W. Chung, D.Z. Liu, S.Y. Wang, S.S. Wang, Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale, *Biomaterials.* 24 (2003) 4655–4661. doi:10.1016/S0142-9612(03)00361-2.
- [200] P. Zilla, D. Bezuidenhout, P. Human, Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing, *Biomaterials.* 28 (2007) 5009–5027.

doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.017.

- [201] M. Ahmed, H. Ghanbari, B.G. Cousins, G. Hamilton, A.M. Seifalian, Small calibre polyhedral oligomeric silsesquioxane nanocomposite cardiovascular grafts: Influence of porosity on the structure, haemocompatibility and mechanical properties, *Acta Biomater.* 7 (2011) 3857–3867. doi:10.1016/j.actbio.2011.06.051.
- [202] Z. Zhang, Z. Wang, S. Liu, M. Kodama, Pore size, tissue ingrowth, and endothelialization of small-diameter microporous polyurethane vascular prostheses, *Biomaterials.* 25 (2004) 177–187. doi:10.1016/S0142-9612(03)00478-2.
- [203] A. Dekker, K. Reitsma, T. Beugeling, A. Bantjes, J. Feijen, W.G. van Aken, Adhesion of endothelial cells and adsorption of serum proteins on gas plasma-treated polytetrafluoroethylene, *Biomaterials.* 12 (1991) 130–138. doi:10.1016/0142-9612(91)90191-C.
- [204] J. Steele, G. Johnson, W. Norris, P. Underwood, Adhesion and growth of cultured human endothelial cells on perfluorosulphonate: role of vitronectin and fibronectin in cell attachment, *Biomaterials.* 12 (1991) 531–539.
- [205] S.W. Myung, Y.M. Ko, B.H. Kim, Effect of plasma surface functionalization on preosteoblast cells spreading and adhesion on a biomimetic hydroxyapatite layer formed on a titanium surface, *Appl. Surf. Sci.* 287 (2013) 62–68. doi:10.1016/j.apsusc.2013.09.064.
- [206] J.N. Barbosa, M.Á.A. Barbosa, A.P. Águas, Inflammatory responses and cell adhesion to self-assembled monolayers of alkanethiolates on gold, *Biomaterials.* 25 (2004) 2557–2563. doi:10.1016/j.biomaterials.2003.09.047.
- [207] C. Sperling, R.B. Schweiss, U. Streller, C. Werner, In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups, *Biomaterials.* 26 (2005) 6547–6557. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.04.042.
- [208] S. Kamath, D. Bhattacharyya, C. Padukudru, R.B. Timmons, L. Tang, Surface chemistry influences implant-mediated host tissue responses, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 86 (2008) 617–626. doi:10.1002/jbm.a.31649.
- [209] L. Tang, Y. Wu, R.B. Timmons, Fibrinogen adsorption and host tissue responses to plasma functionalized surfaces, *J. Biomed. Mater. Res.* 42 (1998) 156–163.

doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199810)42:1<156::AID-JBM19>3.0.CO;2-J.

- [210] S.R. Schricker, M.L.B. Palacio, B. Bhushan, Antibody sensed protein surface conformation, *Mater. Today*. 14 (2011) 616–621. doi:10.1016/S1369-7021(11)70303-0.
- [211] T.J. Kinnari, H. Rihkanen, T. Laine, E.M. Salonen, J. Jero, Albumin-coated tympanostomy tubes: Prospective, double-blind clinical study, *Laryngoscope*. 114 (2004) 2038–2043. doi:10.1097/01.mlg.0000147944.20676.17.
- [212] K. Kottke-Marchant, J.M. Anderson, Y. Umemura, R.E. Marchant, Effect of albumin coating on the in vitro blood compatibility of Dacron® arterial prostheses, *Biomaterials*. 10 (1989) 147–155. doi:10.1016/0142-9612(89)90017-3.
- [213] A.A.A. De Queiroz, É.R. Barrak, H.A.C. Gil, O.Z. Higa, Surface studies of albumin immobilized onto PE and PVC films, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 8 (1997) 667–681. doi:10.1163/156856297X00489.
- [214] M. Baican, E. Pâslaru, E.G. Hitruc, C. Vasile, Albumin immobilization on polyvinylidene fluoride surfaces, *Dig. J. Nanomater. Biostructures*. 6 (2011) 1053–1064.
- [215] B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2004. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
- [216] G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, T. Beugeling, W.G. van Aken, J. Feijen, Blood compatibility of surfaces with immobilized albumin-heparin conjugate and effect of endothelial cell seeding on platelet adhesion., *J. Biomed. Mater. Res.* 47 (1999) 279–91. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<279::AID-JBM1>3.0.CO;2-W [pii].
- [217] B. Sweryda-Krawiec, H. Devaraj, G. Jacob, J.J. Hickman, A New Interpretation of Serum Albumin Surface Passivation, *Langmuir*. 20 (2004) 2054–2056. doi:10.1021/la034870g.
- [218] R.C. Eberhart, M.S. Munro, J.R. Frautschi, M. Lubin, F.J. Clubb, C.W. Miller, V.I. Sevastianov, Influence of Endogenous Albumin Binding on Blood-Material Interactions, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 516 (1987) 78–95. doi:10.1111/j.1749-6632.1987.tb33032.x.

- [219] T.J. Kinnari, H. Rihkanen, T. Laine, E.M. Salonen, J. Jero, Role of albumin coating of tympanostomy tubes: Long-term clinical evaluation, *Laryngoscope*. 117 (2007) 2213–2217. doi:10.1097/MLG.0b013e3181468631.
- [220] T.J. Kinnari, E.M. Salonen, J. Jero, Durability of the binding inhibition of albumin coating on tympanostomy tubes, *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 67 (2003) 157–164. doi:10.1016/S0165-5876(02)00364-6.
- [221] R. Guidoin, R. Snyder, L. Martin, K. Botzko, M. Marois, J. Awad, M. King, D. Domurado, M. Bedros, C. Gosselin, Albumin Coating of a Knitted Polyester Arterial Prosthesis: An Alternative to Preclotting, *Ann. Thorac. Surg.* 37 (1984) 457–465. doi:10.1016/S0003-4975(10)61131-9.
- [222] T. Barrowcliffe, B. Mulloy, E. Johnson, D. Thomas, The anticoagulant activity of heparin: measurement and relationship to chemical structure, *J Pharm Biomed Anal.* 7 (1989) 217–226.
- [223] S. Murugesan, J. Xie, R. Linhardt, Immobilization of heparin: approaches and applications, *Curr Top Med Chem.* 8 (2008) 80–100.
- [224] K. Christensen, R. Larsson, H. Emanuelsson, G. Elgue, A. Larsson, Coagulation and complement activation, *Biomaterials.* 22 (2001) 349–355.
- [225] E. Fosse, S. Thelin, J.L. Svennevig, P. Jansen, T.E. Mollnes, E. Hack, P. Venge, O. Moen, V. Brockmeier, E. Dregelid, E. Haldén, L. Hagman, V. Videm, T. Pedersen, B. Mohr, Duraflo II coating of cardiopulmonary bypass circuits reduces complement activation, but does not affect the release of granulocyte enzymes in fully heparinized patients: A European multicentre study, *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* 11 (1997) 320–327. doi:10.1016/S1010-7940(96)01062-7.
- [226] V. Videm, T.E. Mollnes, K. Bergh, E. Fosse, B. Mohr, T.A. Hagve, A.O. Aasen, J.L. Svennevig, Heparin-coated cardiopulmonary bypass equipment. II. Mechanisms for reduced complement activation in vivo, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 117 (1999) 803–809. doi:10.1016/S0022-5223(99)70302-8.
- [227] M. Levy, A. Hartman, Heparin-coated bypass circuits in cardiopulmonary bypass: improved biocompatibility or not, *Int J Cardiol.* 43 (n.d.) S81-87.
- [228] L. Lu, Q.L. Li, M.F. Maitz, J.L. Chen, N. Huang, Immobilization of the direct thrombin

- inhibitor-bivalirudin on 316L stainless steel via polydopamine and the resulting effects on hemocompatibility in vitro, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 100 A (2012) 2421–2430. doi:10.1002/jbm.a.34143.
- [229] S. Sarkar, K.M. Sales, G. Hamilton, A.M. Seifalian, Addressing thrombogenicity in vascular graft construction, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 82 (2007) 100–108. doi:10.1002/jbm.b.30710.
- [230] A.G. Kidane, H. Salacinski, A. Tiwari, K.R. Bruckdorfer, A.M. Seifalian, Anticoagulant and antiplatelet agents: Their clinical and device application(s) together with usages to engineer surfaces, *Biomacromolecules*. 5 (2004) 798–813. doi:10.1021/bm0344553.
- [231] A. De Mel, F. Murad, A.M. Seifalian, Nitric Oxide : A Guardian for Vascular Grafts ?, *Chem. Rev.* 3 (2011) 5742–5767. doi:10.1590/S1413-73722008000300001.
- [232] G. Decher, J.D. Hong, J. Schmitt, Build up of ultrathin multilayer films by a self-assembly process:III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces, *Thin Solid Films*. (1992) 831–835. doi:10.1016/0040-6090(92)90417-A.
- [233] T. Wu, C. Huang, D. Li, A. Yin, W. Liu, J. Wang, J. Chen, H. El-Hamshary, S.S. Al-Deyab, X. Mo, A multi-layered vascular scaffold with symmetrical structure by bi-directional gradient electrospinning, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 133 (2015) 179–188. doi:10.1016/j.colsurfb.2015.05.048.
- [234] B. Thierry, F.M. Winnik, Y. Merhi, J. Silver, M. Tabrizian, Bioactive coatings of endovascular stents based on polyelectrolyte multilayers, *Biomacromolecules*. 4 (2003) 1564–1571. doi:10.1021/bm0341834.
- [235] G.T. Howard, Biodegradation of polyurethane: A review, in: *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 2002: pp. 245–252. doi:10.1016/S0964-8305(02)00051-3.
- [236] L. Xue, H.P. Greisler, Biomaterials in the development and future of vascular grafts, *J. Vasc. Surg.* 37 (2003) 472–480. doi:10.1067/mva.2003.88.
- [237] S. Gogolewski, Selected topics in biomedical polyurethanes. A review, *Colloid Polym. Sci.* 267 (1989) 757–785. doi:10.1007/BF01410115.
- [238] J.P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R.S. Labow, Understanding the

- biodegradation of polyurethanes: From classical implants to tissue engineering materials, *Biomaterials*. 26 (2005) 7457–7470. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.05.079.
- [239] M.C. Tanzi, D. Mantovani, P. Petrini, R. Guidoin, G. Laroche, Chemical stability of polyether urethanes versus polycarbonate urethanes, *J. Biomed. Mater. Res.* 36 (1997) 550–559. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19970915)36:4<550::AID-JBM14>3.0.CO;2-E.
- [240] I.D. Maya, J. Weatherspoon, C.J. Young, J. Barker, M. Allon, Increased risk of infection associated with polyurethane dialysis grafts, *Semin. Dial.* 20 (2007) 616–620. doi:10.1111/j.1525-139X.2007.00372.x.
- [241] S.A. Guelcher, Biodegradable Polyurethanes: Synthesis and Applications in Regenerative Medicine, *Tissue Eng. Part B Rev.* (2008). doi:10.1089/teb.2007.0133.
- [242] R.S. Labow, E. Meek, L.A. Matheson, J.P. Santerre, Human macrophage-mediated biodegradation of polyurethanes: Assessment of candidate enzyme activities, *Biomaterials*. 23 (2002) 3969–3975. doi:10.1016/S0142-9612(02)00137-0.
- [243] J.E. McBane, S. Sharifpoor, K. Cai, R.S. Labow, J.P. Santerre, Biodegradation and in vivo biocompatibility of a degradable, polar/hydrophobic/ionic polyurethane for tissue engineering applications, *Biomaterials*. 32 (2011) 6034–6044. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.048.
- [244] J.E. McBane, D. Ebadi, S. Sharifpoor, R.S. Labow, J.P. Santerre, Differentiation of monocytes on a degradable, polar, hydrophobic, ionic polyurethane: Two-dimensional films vs. three-dimensional scaffolds, *Acta Biomater.* 7 (2011) 115–122. doi:10.1016/j.actbio.2010.08.014.
- [245] K.S. Brockman, J.N. Kizhakkedathu, J.P. Santerre, Hemocompatibility studies on a degradable polar hydrophobic ionic polyurethane (D-PHI), *Acta Biomater.* 48 (2017) 368–377. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.005.
- [246] K.S. Brockman, B.F.L. Lai, J.N. Kizhakkedathu, J.P. Santerre, Hemocompatibility of Degrading Polymeric Biomaterials: Degradable Polar Hydrophobic Ionic Polyurethane versus Poly(lactic-co-glycolic) Acid, *Biomacromolecules*. 18 (2017) 2296–2305. doi:10.1021/acs.biomac.7b00456.
- [247] F. Grinnell, M.K. Feld, Fibronectin adsorption on hydrophilic and hydrophobic

- surfaces detected by antibody binding and analyzed during cell adhesion in serum-containing medium., *J. Biol. Chem.* (1982). doi:7068668.
- [248] F. Boccafoschi, C. Mosca, M. Ramella, I. Carmagnola, V. Chiono, G. Ciardelli, M. Cannas, Biological evaluation of materials for cardiovascular application: The role of the short-term inflammatory response in endothelial regeneration, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2013). doi:10.1002/jbm.a.34630.
- [249] K.G. Battiston, B. Ouyang, E. Honarparvar, J. Qian, R.S. Labow, C.A. Simmons, J.P. Santerre, Interaction of a block-co-polymeric biomaterial with immunoglobulin G modulates human monocytes towards a non-inflammatory phenotype, *Acta Biomater.* 24 (2015) 35–43. doi:10.1016/j.actbio.2015.06.003.
- [250] S.A. Gregory, J.H. Morrissey, T.S. Edgington, Regulation of tissue factor gene expression in the monocyte procoagulant response to endotoxin., *Mol. Cell. Biol.* 9 (1989) 2752–5. doi:10.1128/MCB.9.6.2752.Updated.
- [251] P. Chen, S. Migita, K. Kanehira, S. Sonezaki, A. Taniguchi, Development of Sensor Cells Using NF-kappa B Pathway Activation for Detection of Nanoparticle-Induced Inflammation, *Sensors.* (2011). doi:10.3390/s110707219.
- [252] T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.-C. Sun, NF-κB signaling in inflammation, *Signal Transduct. Target. Ther.* (2017). doi:10.1038/sigtrans.2017.23.
- [253] J.M. Anderson, K. Defife, A. McNally, T. Collier, C. Jenney, Monocyte, macrophage and foreign body giant cell interactions with molecularly engineered surfaces, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* (1999). doi:238415 [pii].
- [254] L. Mao, L. Shen, J. Chen, X. Zhang, M. Kwak, Y. Wu, R. Fan, L. Zhang, J. Pei, G. Yuan, C. Song, J. Ge, W. Ding, A promising biodegradable magnesium alloy suitable for clinical vascular stent application, *Sci. Rep.* (2017). doi:10.1038/srep46343.
- [255] R. Lee, J.C. Williams, N. Mackman, P2X7 regulation of macrophage tissue factor activity and microparticle generation, *J. Thromb. Haemost.* (2012). doi:10.1111/j.1538-7836.2012.04842.x.
- [256] N.G. Menzyanova, S. V. Pyatina, E.D. Nikolaeva, A. V. Shabanov, I. V. Nemtsev, D.P. Stolyarov, D.B. Dryganov, E. V. Sakhnov, D.A. Vinokurova, E.I. Shishatskaya, Morphological Aspects of Monocyte/Macrophage Polarization on Biopolymer



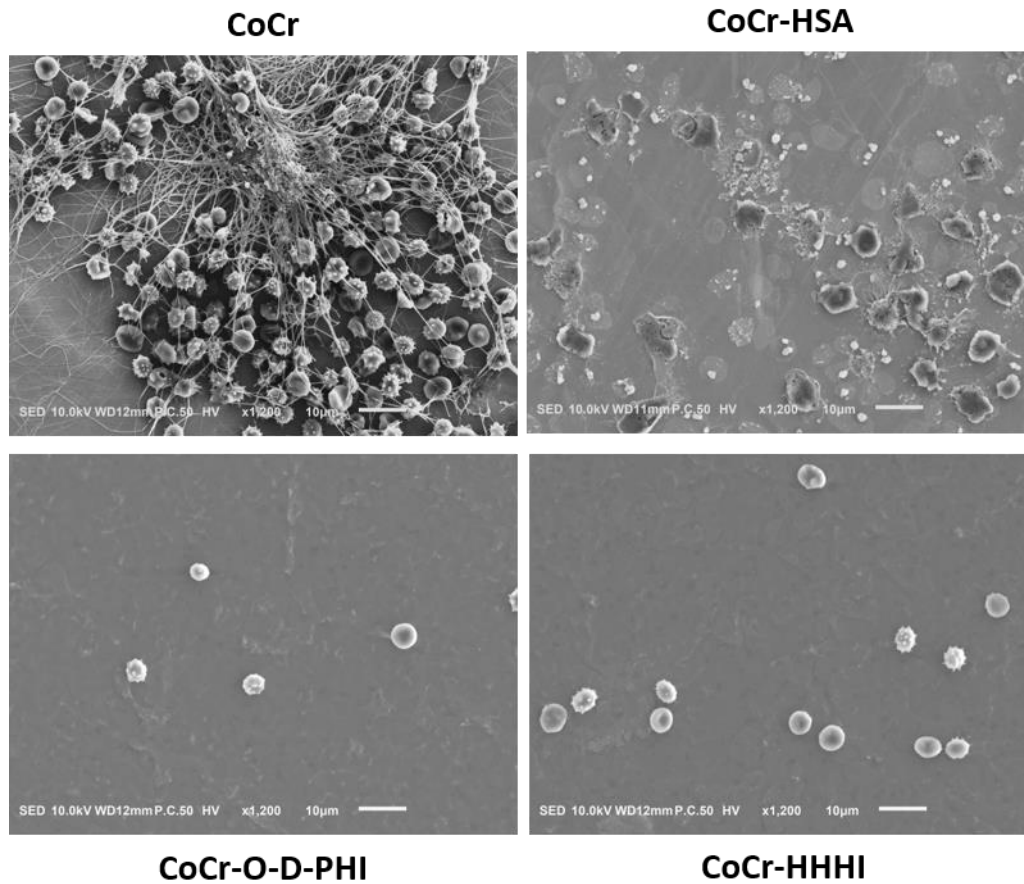
- Scaffolds in Atherosclerosis Patients, *J. Biotechnol. Biomater.* 8 (2018) DOI: 10.4172/2155-952X.1000284.
- [257] K.R. Fernandes, Y. Zhang, A.M.P. Magri, A.C.M. Renno, J.J.J.P. Van Den Beucken, Biomaterial Property Effects on Platelets and Macrophages: An in Vitro Study, *ACS Biomater. Sci. Eng.* (2017). doi:10.1021/acsbiomaterials.7b00679.
- [258] Y. Xu, R. Romero, D. Miller, L. Kadam, T.N. Mial, O. Plazyo, V. Garcia-Flores, S.S. Hassan, Z. Xu, A.L. Tarca, S. Drewlo, N. Gomez-Lopez, An M1-like Macrophage Polarization in Decidual Tissue during Spontaneous Preterm Labor That Is Attenuated by Rosiglitazone Treatment, *J. Immunol.* (2016). doi:10.4049/jimmunol.1502055.
- [259] M.A. Kowalska, L. Rauova, M. Poncz, Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis, *Thromb. Res.* (2010). doi:10.1016/j.thromres.2009.11.023.
- [260] L.A. Dudash, F. Kligman, S.M. Sarett, K. Kottke-Marchant, R.E. Marchant, Endothelial cell attachment and shear response on biomimetic polymer-coated vascular grafts, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* (2012). doi:10.1002/jbm.a.34119.
- [261] I.L.A. Geenen, D.G.M. Molin, N.M.S. van den Akker, F. Jeukens, H.M. Spronk, G.W.H. Schurink, M.J. Post, Endothelial cells (ECs) for vascular tissue engineering: Venous ECs are less thrombogenic than arterial ECs, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2015). doi:10.1002/term.1642.

## **Annexes**

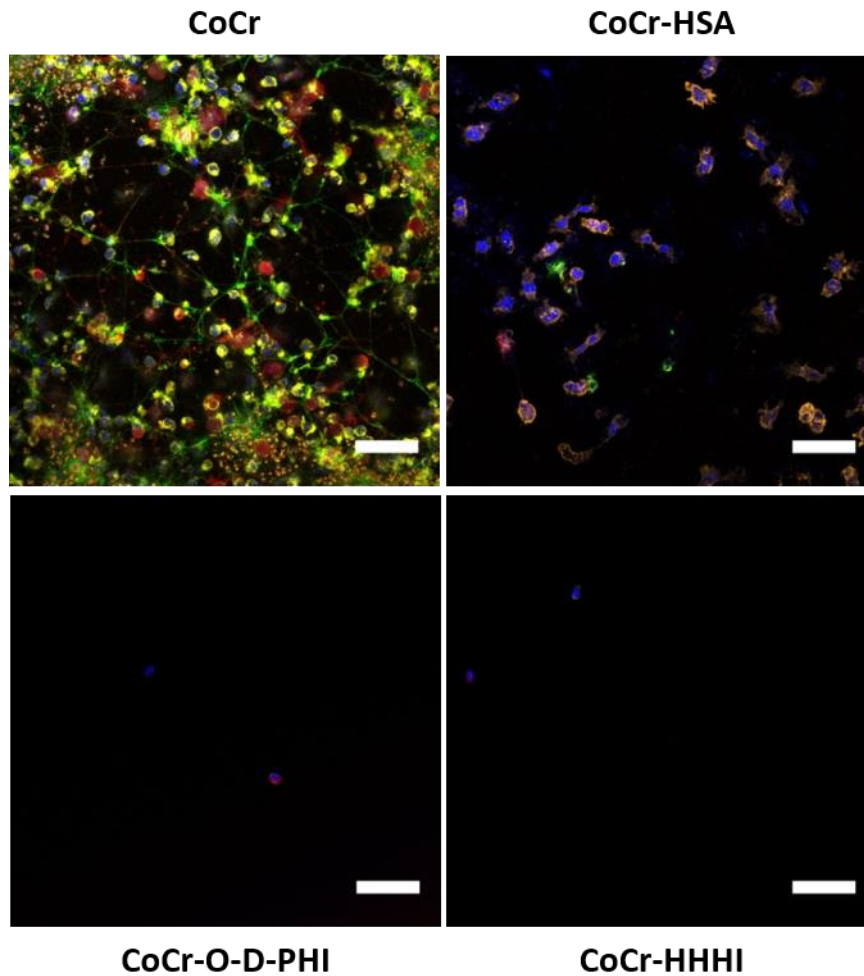
---

I. **Annex 1: Results related to Article 3 including unpublished O-D-PHI coating**

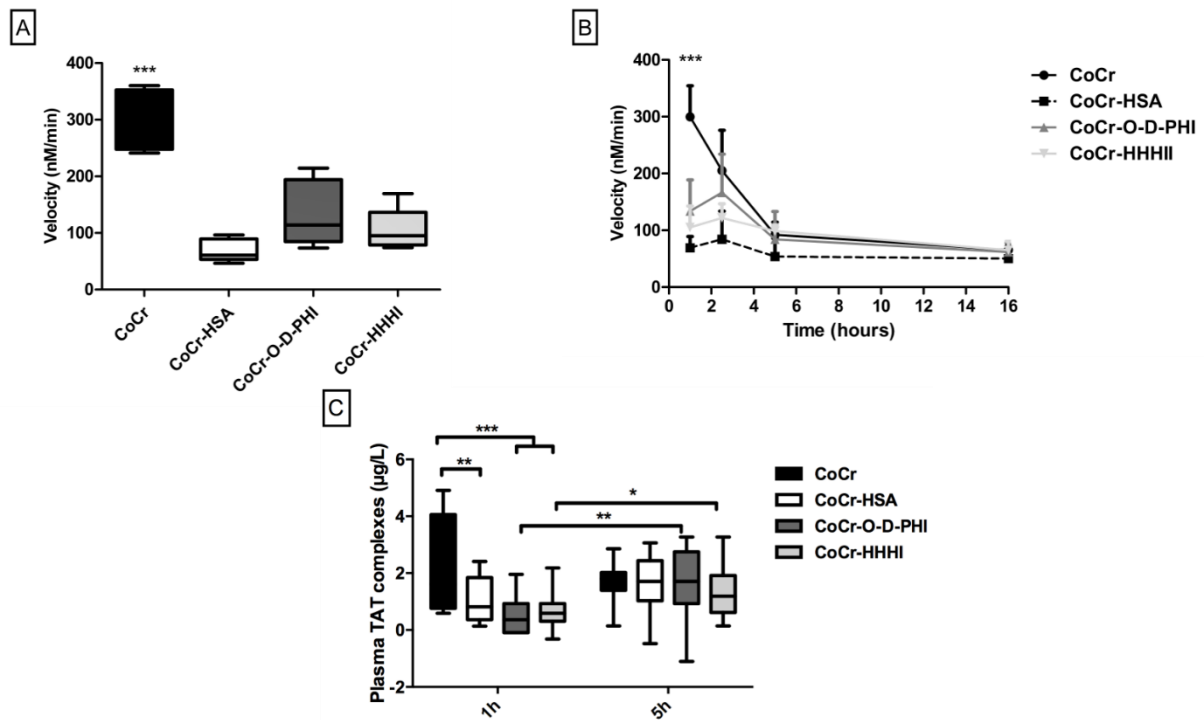
**Figures**



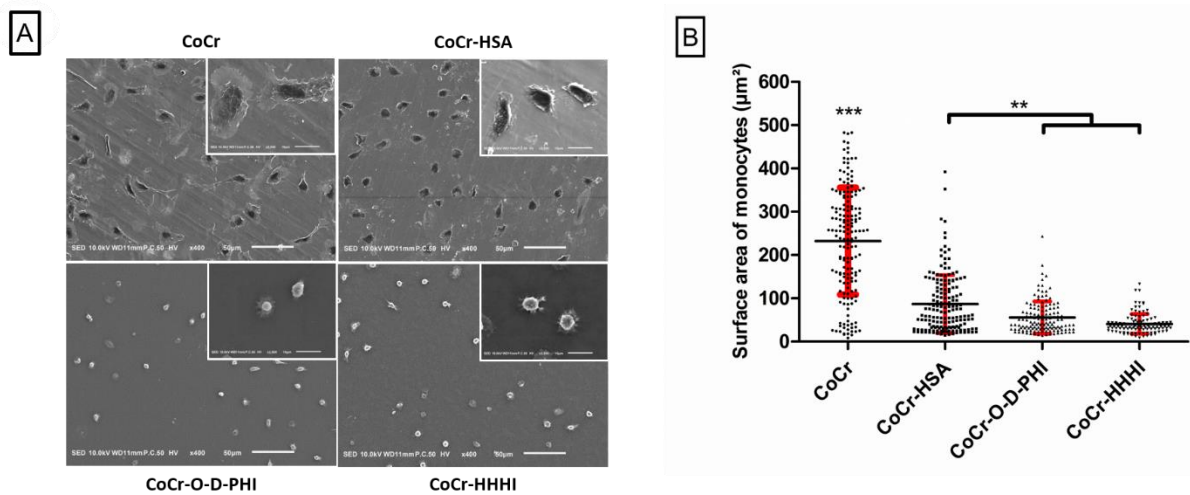
**Figure 1:** Cell morphology after 24h incubation at 37°C of whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Representative images obtained by SEM are shown. *n*=3, triplicate with 3 different blood donors. Scale bar = 10 µm



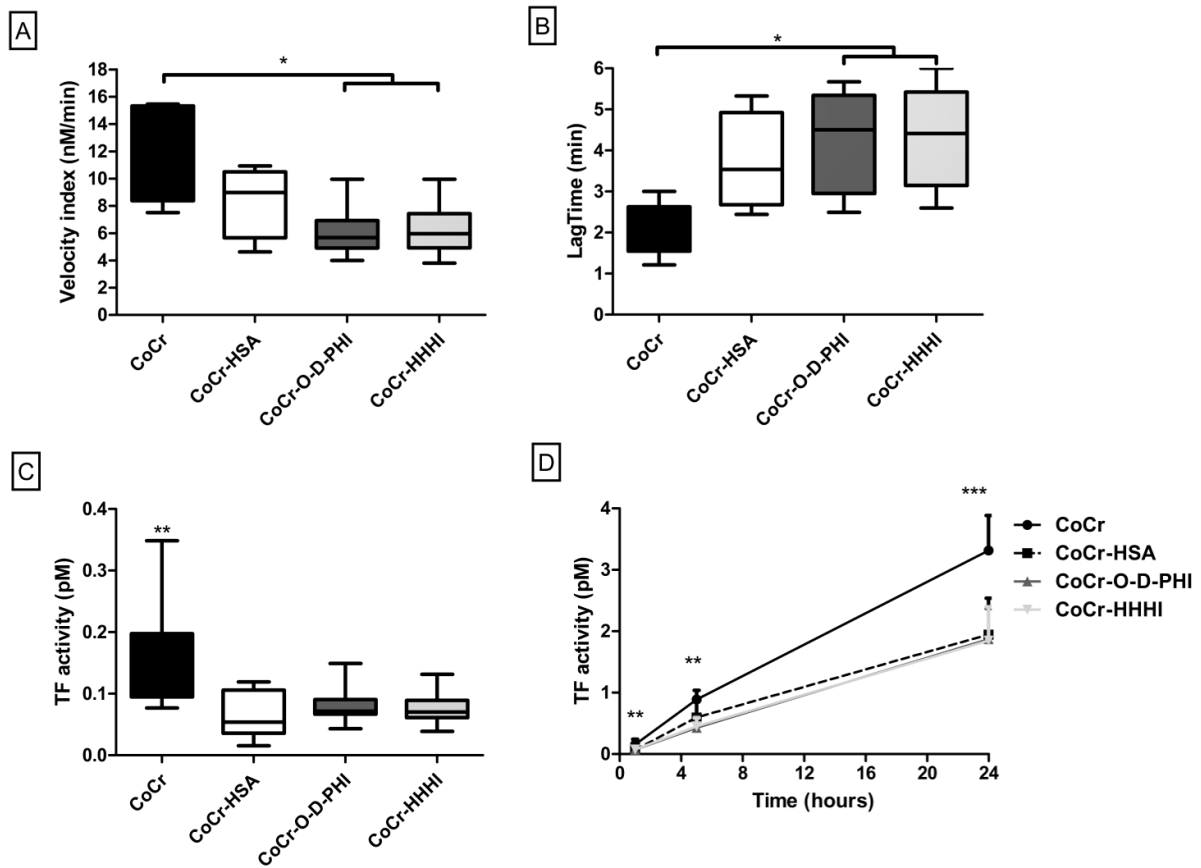
**Figure 2:** Immunostaining after 24h incubation at 37°C of whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI and HHHI. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Cell nuclei (blue), fibrin (green), platelets (red) and leukocytes (yellow).  $n=2$ , triplicate with 2 different blood donors, Scale bar = 50  $\mu\text{m}$ .



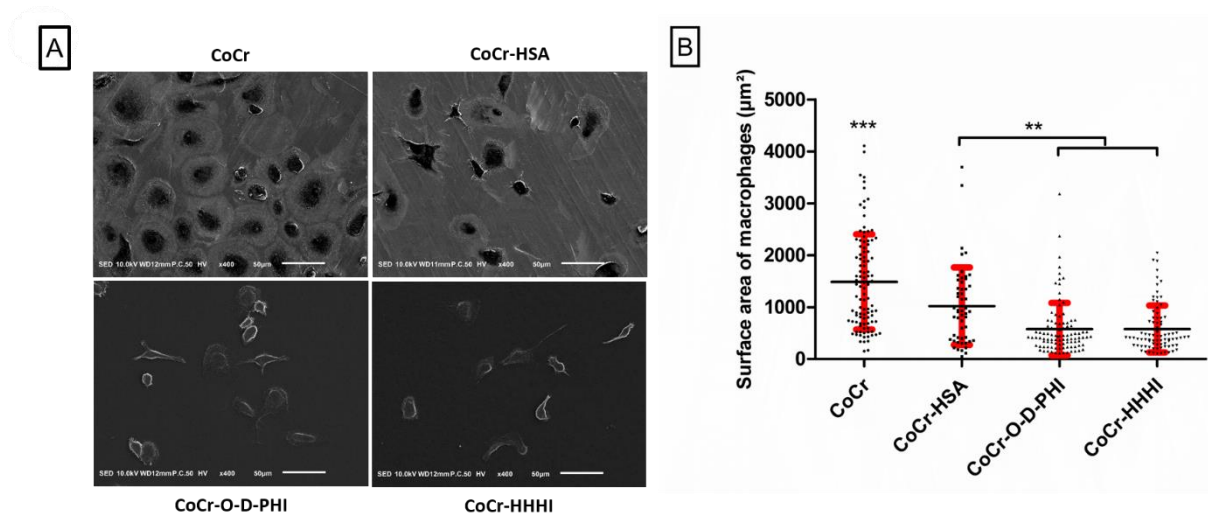
**Figure 3:** Thrombin generation and TAT complexes in whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A - B) Thrombin generation (CAT): Velocity after 1h of incubation (A) and Kinetic at 1h, 2h30, 5h and 16h of incubation at 37°C (B).  $n=2-4$ , triplicates with 2-4 different blood donors, Mean  $\pm$  SD,  $***p < 0.001$ . C) Quantification (ELISA) of Thrombin/Antithrombin complexes in plasma after 1h or 5h of whole blood incubation at 37°C.  $n=6$ , triplicates with 6 different blood donors, Mean  $\pm$  SD,  $**p < 0.01$  and  $*p < 0.05$ .



**Figure 4:** Morphology of isolated monocytes after 24h of incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A) Representative images obtained by SEM are shown.  $n=3$ , triplicate with 3 different blood donors. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  and 10  $\mu\text{m}$  (inset). B) Measurement of surface area from SEM images. Each point represents the surface area of one monocyte. 18 images were measured per conditions. Mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$ .

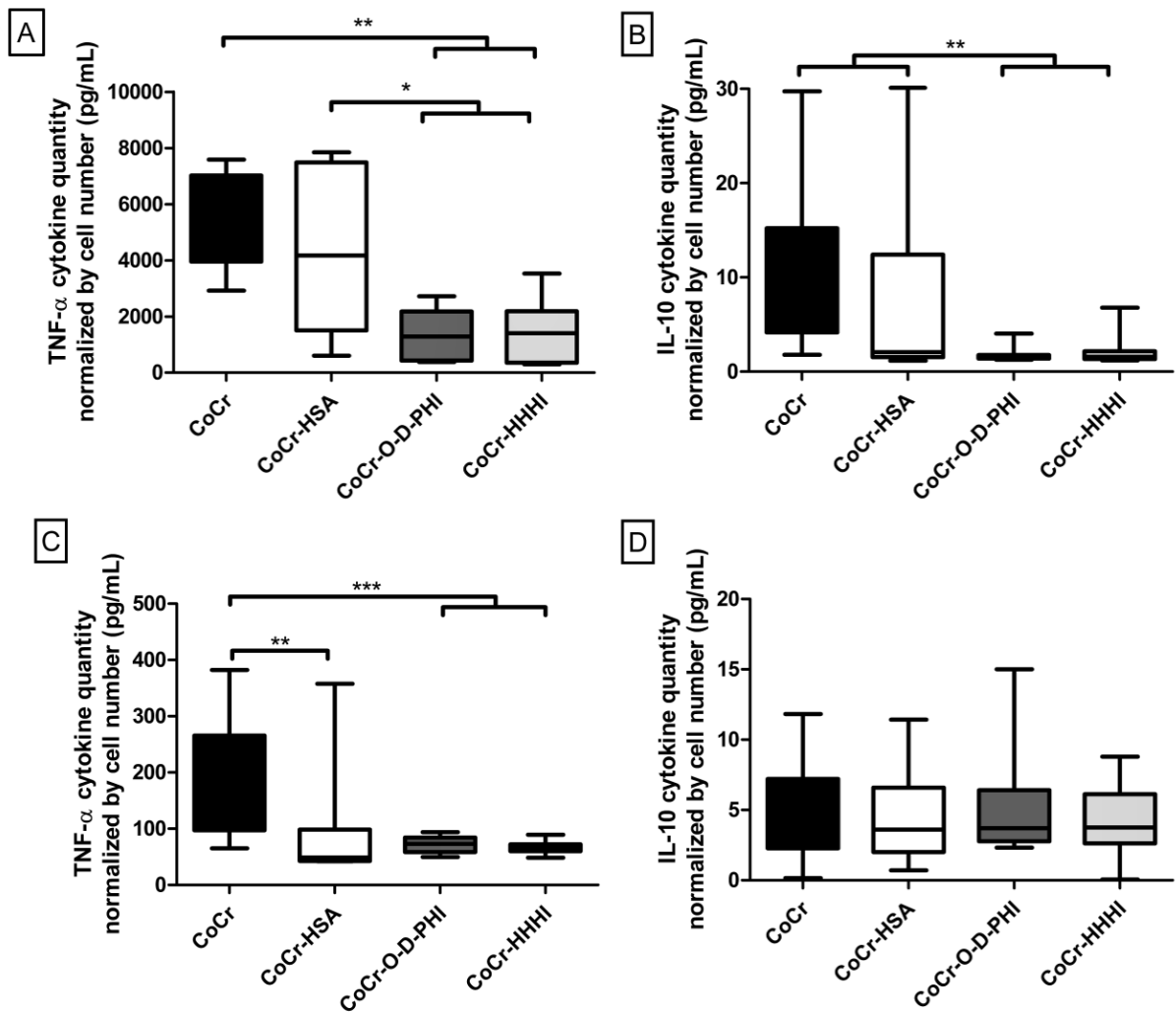


**Figure 5:** Thrombin generation and TF activity of isolated monocytes incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A - B) Thrombin generation (CAT): Velocity index (A) and Lagtime (B) after 24h of incubation at 37°C.  $n=6$ , triplicates with 6 different blood donors, Mean  $\pm$  SD,  $*p < 0.05$ . C-D) TF activity after 1h of incubation (C) and Kinetic at 1h, 5h et 24h of incubation at 37°C (D).  $n=5$ , triplicates with 5 different blood donors, Mean  $\pm$  SD.  $***p < 0.001$  and  $**p < 0.01$ .

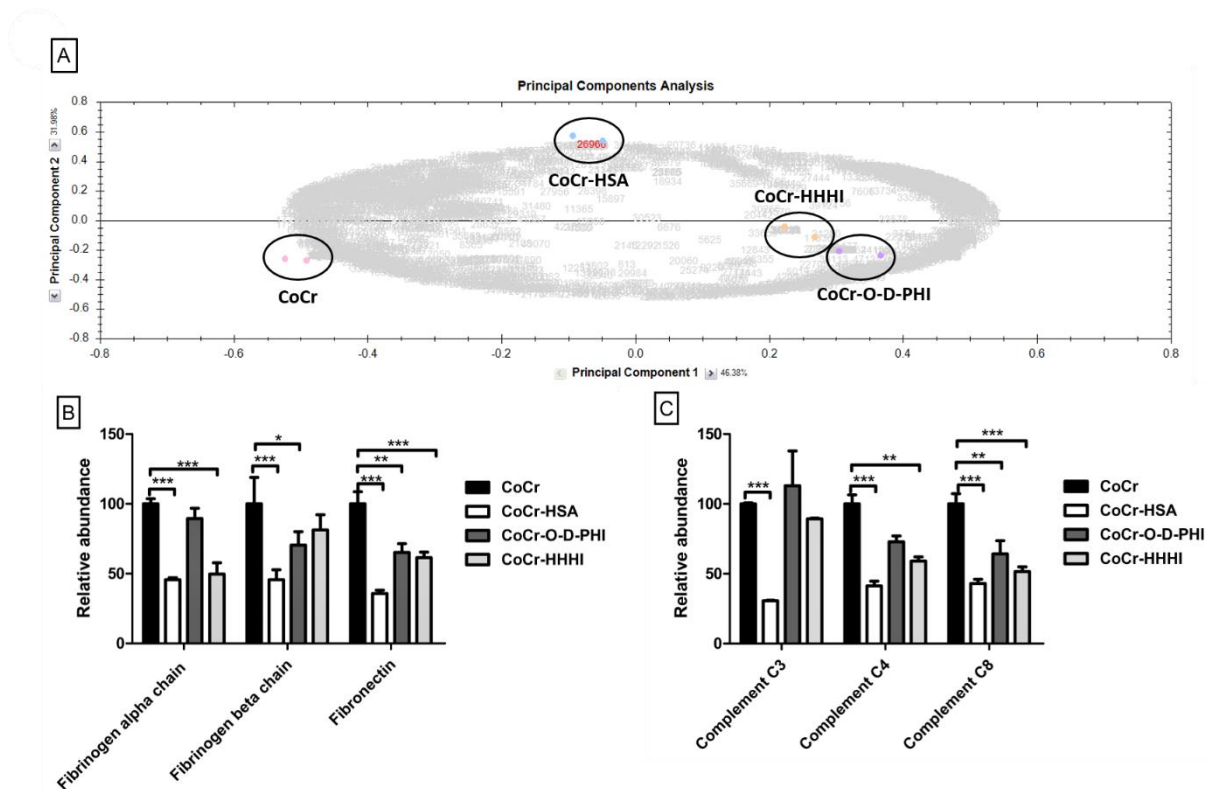


**Figure 6:** A) Morphology of isolated macrophages after 8 days of incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A) Representative images obtained by SEM are shown.  $n=3$ , triplicate with 3 different blood donors. Scale bar = 50 µm. B) Measurement of surface area from SEM images. Each point represents the surface area of one monocyte. 18 images were measured per conditions. Mean  $\pm$  SD. \*\*\* $p < 0.001$  and \*\* $p < 0.01$ .

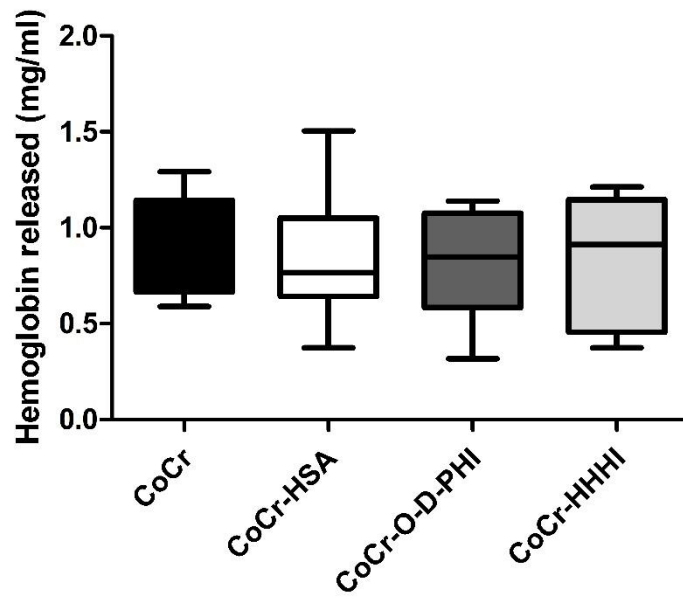




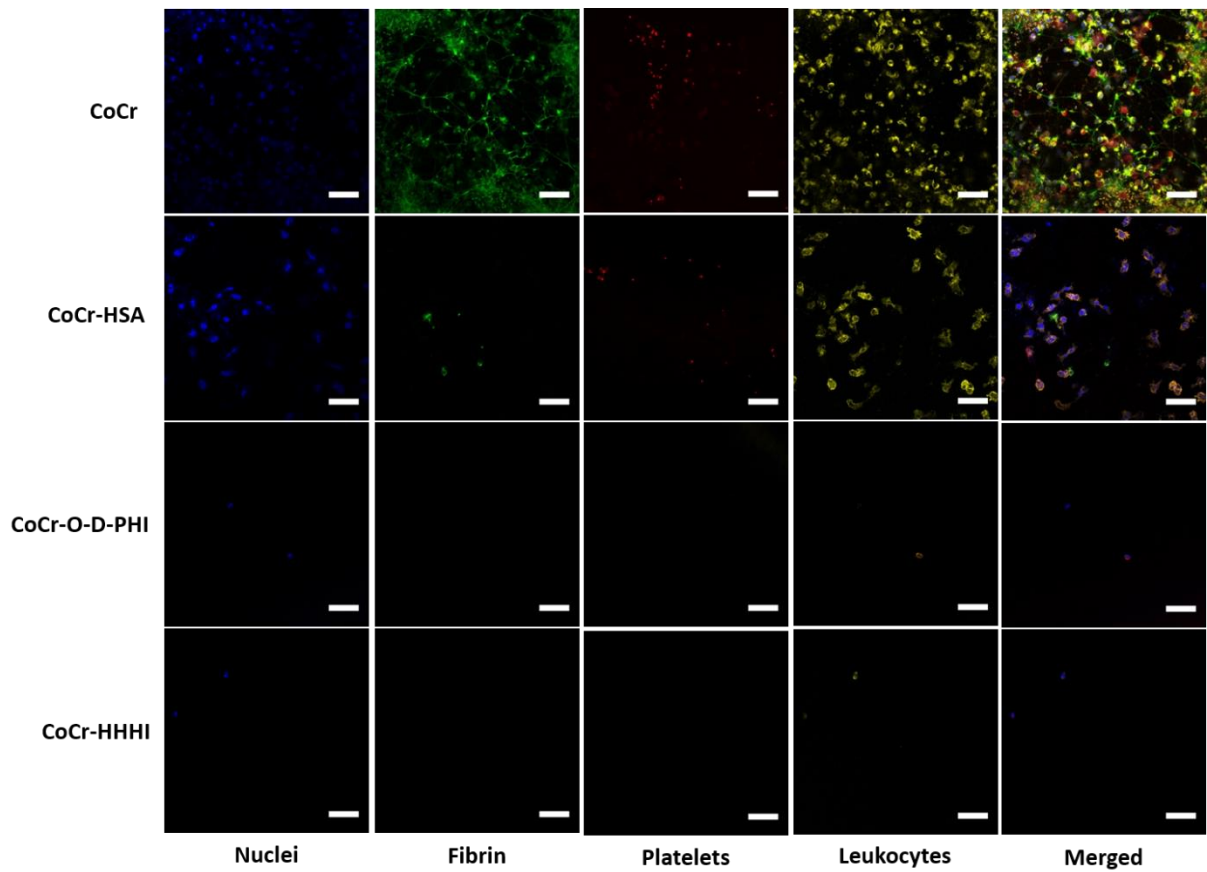
**Figure 7:** Quantification (ELISA) of TNF- $\alpha$  and IL-10 in the 24h supernatant of monocytes (A-B) and macrophages (C-D) incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Results are normalized by cells quantity.  $n=6$ , duplicates with 6 different blood donors, Mean  $\pm$  SEM, \*\*\* $p<0.001$ , \*\* $p<0.01$  and \* $p<0.05$ .



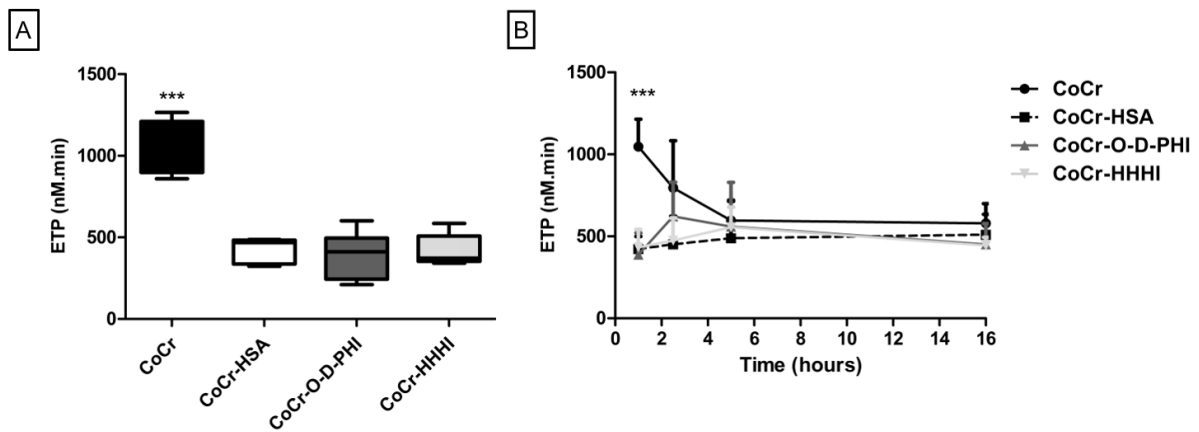
**Figure 8:** Principal components analysis (PCA) and compared relative abundance of specific proteins by mass spectrometry on the different surfaces (bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI) after 2h of incubation of PPP. A) Graphical representations of the PCA results (principal components 1 and 2). B) Illustration of relative quantification for proteins fibrinogen alpha chain, beta chain and fibronectin and C) complement C3, complement C4, complement C8. The results are presented as mean  $\pm$  SEM. CoCr was used as a reference material and considered as a 100%.  $n=3$ , duplicate with pool of 18 different blood donors. Mean  $\pm$  SEM, \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  and \* $p < 0.05$ .



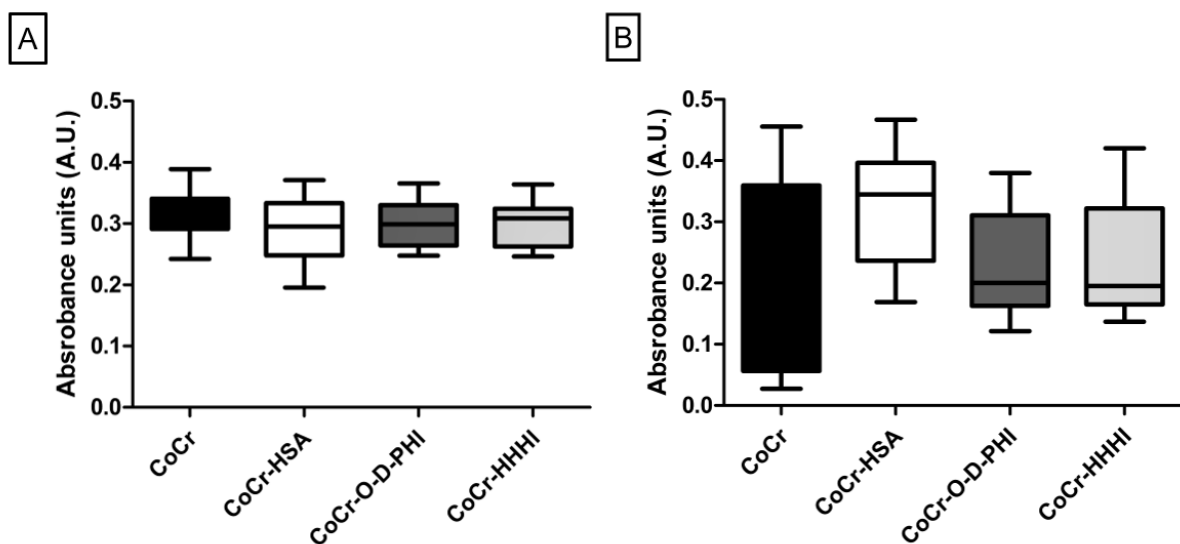
*Supplementary Figure S2: Quantification of hemolysis after 24h of whole blood incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. n=3, triplicates with 3 different blood donors.*



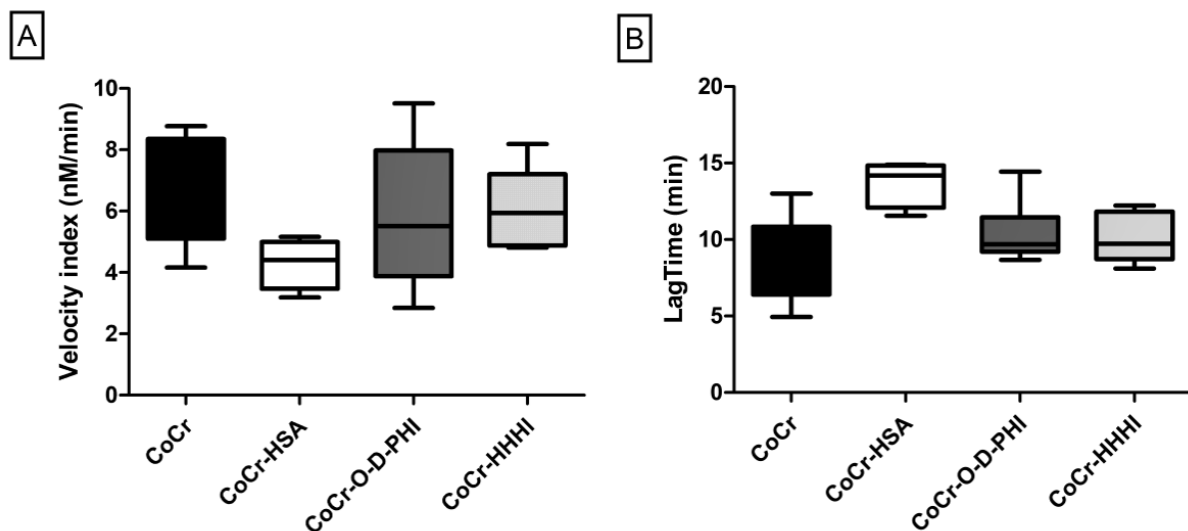
**Supplementary Figure S3:** Immunostaining after 24h of incubation of whole blood at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Cell nuclei (blue), fibrin (green), platelets (red) and leukocytes (yellow). n=2, triplicate with 2 different blood donors, Scale bar = 50 μm.



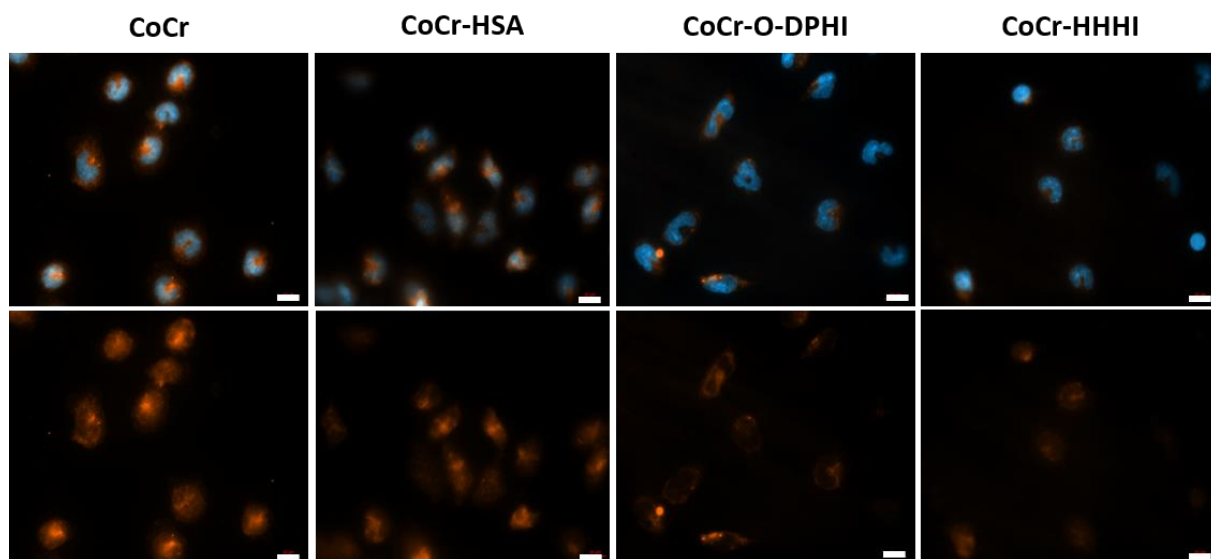
**Supplementary Figure S4:** Thrombin generation in whole blood on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A) ETP after 1h of incubation and B) Kinetic at 1h, 2h30, 5h and 16h of incubation at 37°C. n=2-4, triplicates with 2-4 different blood donors, Mean ± SD, \*\*\*p<0.001.



**Supplementary Figure S5:** Quantification of monocytes (A) and macrophages (B) viability by LDH assay after 24h (monocytes) or 8 days (macrophages) of incubation at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. n=6, triplicates with 6 different blood donors. Mean ± SD.



**Supplementary Figure S6:** Thrombin generation in poor platelet plasma (PPP) incubated on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. A) Velocity index and B) Lagtime after 24h of incubation at 37°C. n=6, triplicates with 6 different blood donors, Mean ± SD.



**Supplementary Figure S7:** Immunostaining after 1h of incubation of isolated monocytes at 37°C on bare CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Representative images obtained by confocal microscopy are shown. Cell nuclei (blue) and NF-κB (orange). n=2, duplicate with 2 different blood donors, Scale bar = 10 μm.

## **II. Annex 2: Effect of polyurethane coatings on platelets reactivity**

### **Material and Methods**

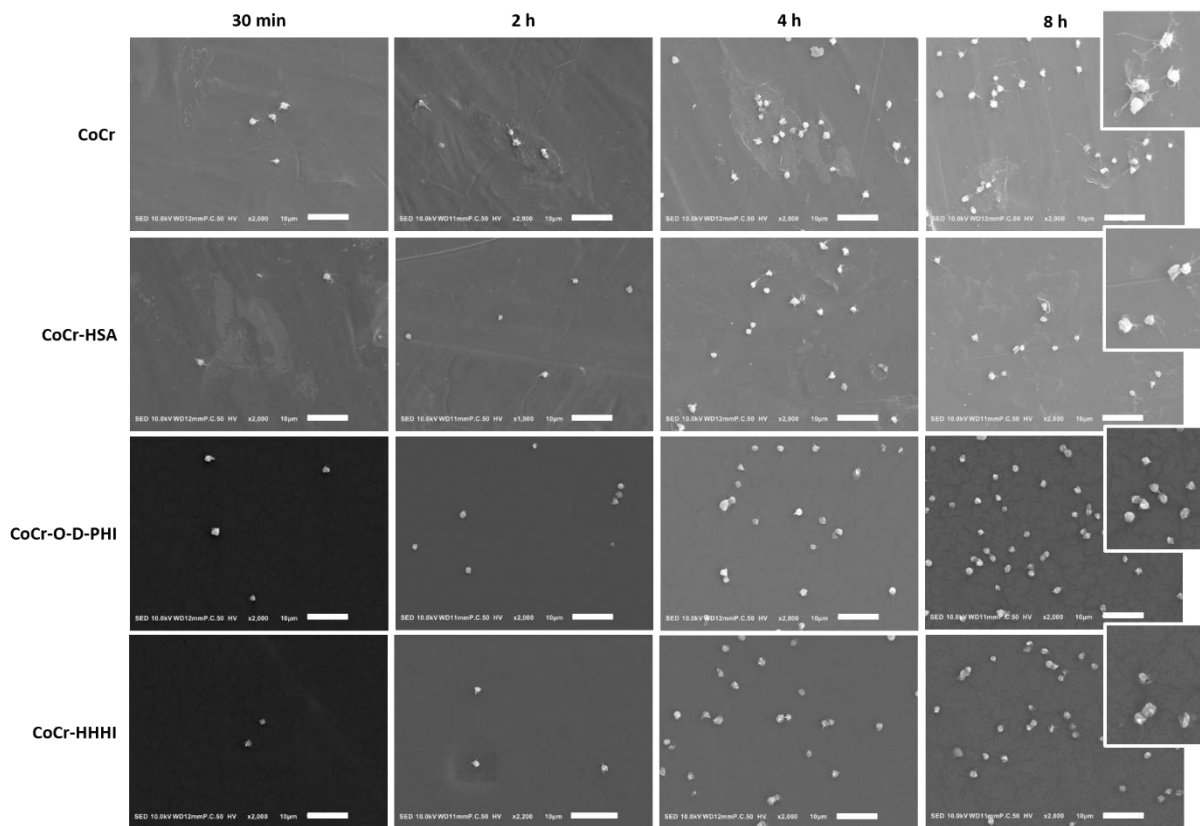
#### **Preparation of platelet-rich plasma (PRP):**

The platelet-rich plasma (PRP) was prepared from citrated blood (sodium citrate 0.129 M) using a centrifugation protocol. Whole blood was centrifuged at 120 g for 15 min. The PRP was then collected and the platelets concentration was adjusted to  $2.10^6$ /mL with autologous platelet free plasma (PFP) prepared by a double centrifugation at 2500 g for 15 min at 20°C.

#### **Measurement of PF4 release**

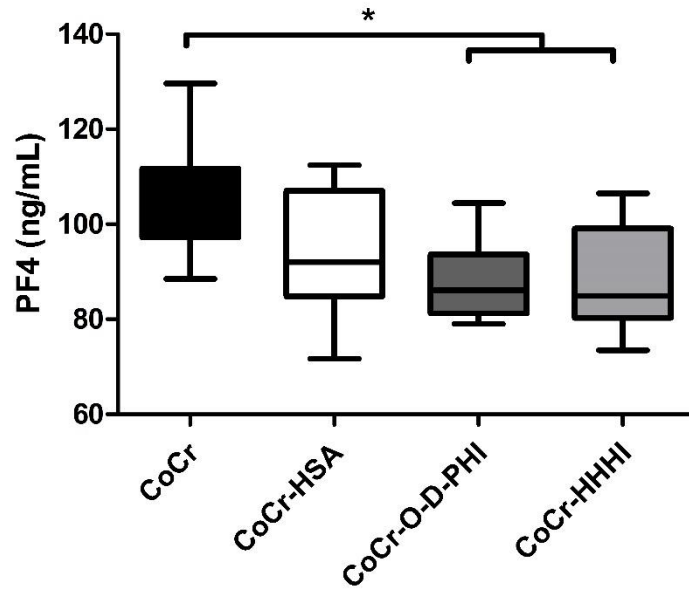
Platelet factor 4 (PF4) levels in supernatants were assayed using an ELISA kit (R&D Systems, Abington, UK) according to the manufacturer's instructions. The supernatants were collected then centrifuged at 1200g for 5 min before PF4 assay.

## Figures



**Figure 1:** Morphology of platelets after 30 min, 2h, 4h or 8h of incubation on CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Representative images obtained by SEM are shown.  $n=3$ , triplicate with 3 different blood donors. Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$





**Figure 2:** PF4 released by platelets after 4h of incubation on CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI.  $n=6$ , duplicate with 6 different blood donors. Mean  $\pm$  SD,  $*p < 0.05$ .

### **III. Annex 3: Effect of polyurethane coatings on neutrophils reactivity**

#### **Material and Methods**

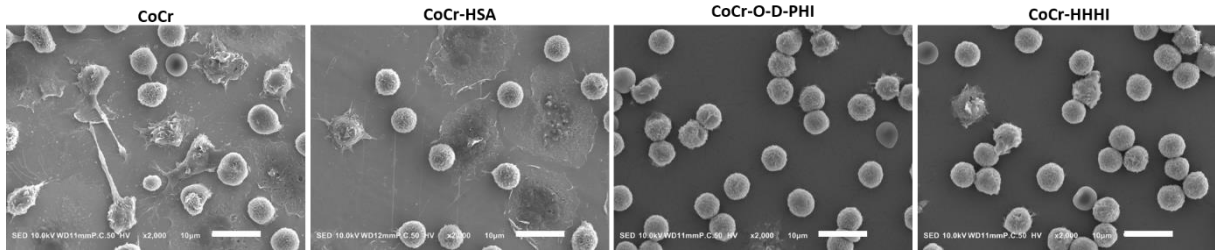
##### **Human blood collection and neutrophil isolation**

Blood from healthy volunteers was drawn into siliconized Vacutainer™ tubes (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) containing ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA). Neutrophil isolation was performed using the human MACSxpress® Neutrophil Isolation Kit (MiltenyiBiotec Inc, Paris, France) according to the manufacturer instructions. Isolated neutrophils ( $\geq 95\%$  purity) were suspended at  $3 \times 10^6$  cell/mL in Endothelial basal medium (Promocell).

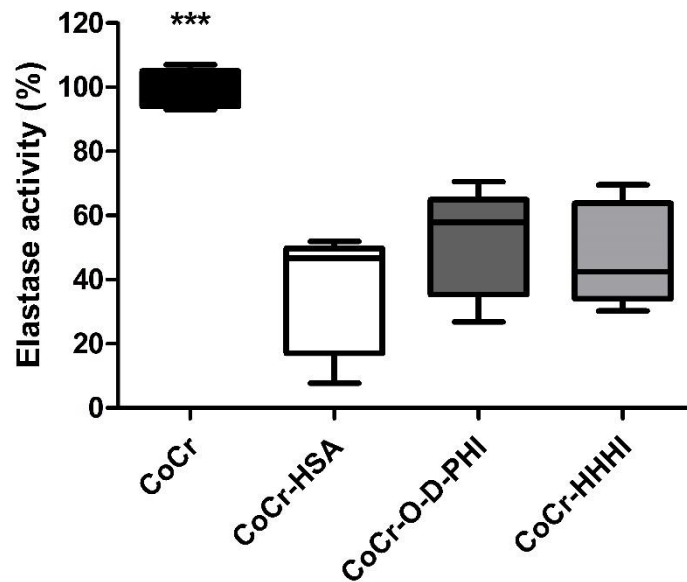
##### **Measurement of elastase activity of neutrophils**

Elastase activity was assessed by adding the substrate MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC (Millipore, East Midlands, United Kingdom,  $16 \mu\text{M}$  final concentration) to samples and the liberation of fluorescent AMC was measured using a fluorescent microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan)

## Figures



**Figure 1:** Morphology of neutrophils after 2h of incubation on CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. Representative images obtained by SEM are shown.  $n=3$ , triplicate with 3 different blood donors. Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$



**Figure 2:** Elastase activity of neutrophils after 2h of incubation on CoCr, CoCr coated with HSA, O-D-PHI or HHHI. CoCr was used as a reference material and considered as a 100%.  $n=3$ , triplicate with 3 different blood donors. Mean  $\pm$  SD, \*\*\* $p < 0.001$ .

# Listes des articles et communications orales

---

## Articles :

- **Gossart, A.**; Battiston, K. G.; Gand, A.; Pauthe, E.; Santerre, J. P. Mono vs Multilayer Fibronectin Coatings on Polar / Hydrophobic / Ionic Polyurethanes : Altering Surface Interactions with Human Monocytes. *Acta Biomater.* **2018**, *66*, 129–140.
- **Gossart, A.**; Gand, A.; Ollivier, V.; Boissière, M.; Santerre, J. P.; Letourneur, D.; Pauthe, E. Coating of cobalt chrome substrates with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: characterization and interaction with human immunoglobulin G and fibronectin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* **2019**, *179*, 114-120.
- **Gossart, A.**; Letourneur, D.; Gand, A.; Regnault, V. ; Ben Mlouka, M. A. ; Cosette, P. ; Pauthe, E. ; Ollivier, V. and Santerre, J. P. Mitigation of monocyte driven thrombosis on Cobalt Chrome surfaces in contact with whole blood by thin film polar/hydrophobic/ionic polyurethane coatings. *Biomaterials*, **2019**, *In press*

## Communications orales :

- **Gossart, A.**; Battiston, K. G.; Gand, A.; Pauthe, E.; Santerre, J. P. Biofunctionalization of degradable polar/hydrophobic/ionic polyurethanes with thin film fibronectin coatings: Study of monocyte behavior. World Biomaterials Congress, 17-22 Mai 2016, Montréal, Canada
- **Gossart, A.**; Gand, A.; Ollivier, V.; Boissière, M.; Santerre, J. P.; Letourneur, D.; Pauthe, E. Protein adsorption and cell behavior on cobalt chrome surfaces, with and without thin film coating of polyurethanes: implication for cardiovascular stent, Biomaterial Congress, 12-16 Juin 2017, Ambleteuse, France (Prix de la meilleure communication orale).

### **Présentation posters :**

- **Gossart, A.**; Battiston, K. G.; Gand, A.; Pauthe, E.; Santerre, J. P. Fibronectin coatings applied onto degradable polar/hydrophobic/ionic polyurethanes: toward controlling human monocyte activity. Biomaterial Congress, 12-14 Octobre 2015, Ile de Ré, France
- **Gossart, A.**; Battiston, K. G.; Gand, A.; Pauthe, E.; Santerre, J. P. Biofunctionalization of degradable polar/hydrophobic/ionic polyurethanes via thin film fibronectin coating : interactions with human monocytes. 1er Forum Franco - Québécois d'Innovation en Santé, 11-12 Octobre 2016, Montréal, Canada
- **Gossart, A.**; Santerre, J. P.; Gand, A.; Pauthe, E. ; Letourneur, D.; Ollivier, V. Attenuation of monocyte-induced procoagulant activity on CoCr surfaces with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes. European Congress on Thrombosis and Haemostasis (ECTH), 24-26 Octobre 2018, Marseille, France
- **Gossart, A.**; Gand, A.; Ollivier, V.; Santerre, J. P.; Letourneur, D. and Pauthe, E. Attenuation of monocyte-induced procoagulant activity on CoCr surfaces with thin films of polar/hydrophobic/ionic polyurethanes. Biomaterial Congress, 3-7 Juin 2019, La Grande-Motte, France

# Résumé

---

La thrombose survenant après implantation d'un biomatériau en contact avec le sang est un problème majeur. L'utilisation de polymères comme supports pour les greffes vasculaires ou comme matériaux de recouvrement pour les endoprothèses vasculaires (stent) peut améliorer leur hémocompatibilité. C'est dans ce contexte que s'insère l'objectif global de cette thèse qui a porté sur l'étude de la biocompatibilité de polyuréthanes, appelés D-PHI (Dégradable-Polar/Hydrophobic/Ionic). Pour cette étude, 2 formulations ont été développées, la formule originale appelé O-D-PHI et la formulation HHHI (High Hydrophobic, High Ionic). Elles sont constituées des mêmes monomères dont les ratios molaires varient, permettant ainsi de moduler les caractères polaires, ioniques et hydrophobes du matériau. L'influence de la chimie intrinsèque de ces matériaux sur l'adsorption et la disponibilité de séquences spécifiques de protéines plasmatiques (fibronectine et immunoglobuline G) ainsi sur l'activation des monocytes a été étudiée. Dans l'optique de recouvrement de stents, des films minces micrométrique de polyuréthanes ont été générés à la surface de cobalt chrome et une caractérisation de surface a été réalisée. L'adsorption et la disponibilité de séquences spécifiques de protéines plasmatiques impliquées dans l'inflammation et la coagulation ont ensuite été évaluées ainsi que la réactivité des cellules du sang. Les résultats ont montré que la formulation et l'épaisseur du film influencent l'adsorption et l'exposition de séquences spécifiques de protéines plasmatiques. En revanche, la réactivité des cellules du sang, l'activation de la coagulation et l'inflammation étaient réduites par la présence de films minces de polyuréthanes, quel que soit l'épaisseur du film et la formulation.

**Mots clés :** Polyuréthane, Cobalt Chrome, Protéines plasmatiques, Monocyte, Sang Total, Coagulation, Inflammation, Hémocompatibilité

# Abstract

---

Thrombosis occurring after implantation of a biomaterial in contact with blood is a major problem. The use of polymers as supports for vascular grafts or as cover materials for stents may improve their hemocompatibility. It is in this context that the overall objective of this thesis is to study the biocompatibility of polyurethanes, called D-PHI (Degradable-Polar / Hydrophobic / Ionic). For this study, 2 formulations were developed, the original formula called O-D-PHI and the formulation HHHI (High Hydrophobic, High Ionic). They consist of the same monomers whose molar ratios vary, thus making it possible to modulate the polar, ionic and hydrophobic characteristics of the material. The influence of the intrinsic chemistry of these materials on the adsorption and availability of specific plasma protein sequences (fibronectin and immunoglobulin G) and in regards to the activation of monocytes has been studied. In order to covering stent, micrometric thin films of polyurethanes were generated at the surface of cobalt chrome and surface characterization was performed. The adsorption and availability of specific plasma protein sequences, involved in inflammation and coagulation, were then evaluated as well as the reactivity of blood cells. The results showed that the formulation and film thickness influence the adsorption and exposure of specific plasma protein sequences. In contrast, blood cell reactivity, coagulation activation, and inflammation were reduced by the presence of thin polyurethane films, regardless of film thickness and formulation.

**Key words:** Polyurethane, Cobalt Chrome, Plasma proteins, Monocyte, Whole blood, Coagulation, Inflammation, Hemocompatibility

**Title: Development of thin films of polyurethane on cobalt chrome: Improvement of the hemocompatibility of a reference metal used in the manufacture of stents**